



Vectorisation de nanoparticules d'imagerie multimodale à base de gadolinium pour un ciblage actif des plaques amyloïdes et de cellules hépatocytes

Marie Plissonneau

► To cite this version:

Marie Plissonneau. Vectorisation de nanoparticules d'imagerie multimodale à base de gadolinium pour un ciblage actif des plaques amyloïdes et de cellules hépatocytes. Autre. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. NNT : 2015LYO10331 . tel-01327938

HAL Id: tel-01327938

<https://theses.hal.science/tel-01327938>

Submitted on 7 Jun 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Année 2015

THESE

Soutenue le 7 décembre 2015

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Lyon _ Université Claude Bernard

Spécialité : Chimie

Institut Lumière Matière, Ecole Doctorale de Chimie de Lyon

Par Marie PLISSONNEAU

Ingénieure ESCPE Lyon

**VECTORISATION DE NANOPARTICULES D'IMAGERIE MULTIMODALE A
BASE DE GADOLINIUM POUR UN CIBLAGE ACTIF DES PLAQUES
AMYLOÏDES ET DE CELLULES HEPATOCYTES**

Rapporteurs :

Karine ANDRIEUX, Professeure de l'Université Paris-Descartes
Muriel BARBERI-HEYOB, Professeure de l'Université de Nancy

Examineurs :

Laurent DAVID, Professeur de l'Université Lyon 1
Christel MARQUETTE, Chercheure IRSN/CEA (Invitée)
Laurence HEINRICH-BALARD, Maître de Conférence, Université Lyon 1 (Invitée)
Cédric LOUIS, Nano-H S.A.S.
Olivier TILLEMENT, Professeur de l'Université de Lyon 1
François LUX, Maître de Conférence, Université Lyon 1

REMERCIEMENTS

Ces trois années de thèse sont le fruit de nombreux échanges et de multiples collaborations. Je tiens donc à remercier et à témoigner ma plus grande reconnaissance à toutes les personnes ayant contribué à ce travail, m'ayant conseillé et soutenue.

Je tiens tout d'abord à remercier Karine Andrieux, Professeure de l'Université de Paris-Descartes et Muriel Barberi-Heyob, Chargée de Recherche à l'Université de Nancy, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse. Je remercie également Laurent David, Professeur de l'Université Lyon 1, Christel Marquette, Chercheure IRSN/CEA et Laurence Heinrich-Balard, Maître de Conférence de l'Université Lyon 1, d'avoir accepté de faire partie du jury.

Je remercie tout particulièrement Olivier Tillement, directeur de l'équipe FENNEC de l'Institut Lumière Matière, de m'avoir accueilli dans son équipe et d'avoir encadré ce travail de thèse, pour ses nombreuses idées et son dynamisme ; ainsi que Cédric Louis, PDG de Nano-H S.A.S, pour m'avoir accueilli au sein de son entreprise. Un grand merci à François Lux pour avoir co-encadré cette thèse, pour ces précieux conseils, pour sa patience et son sens du détail lors des nombreuses relectures.

Au cours de ces trois ans, j'ai eu l'opportunité de participer à l'encadrement de plusieurs stagiaires. Je tiens à tous vous remercier pour votre participation à ce travail et pour votre motivation. Travailler à vos côtés m'a beaucoup appris. Un grand merci donc à David et ses pas de danse, Titou pour son aide et ses muffins, Eloïse, qui est restée avec nous en thèse, pour tout son travail, et en particulier à Morgane qui m'a permis de vivre ces derniers mois de thèse plus sereinement !

Un immense merci à toutes les personnes avec qui j'ai pu interagir sur le projet Dia-Amyl. Laurence Heinrich-Balard, Pascaline Rivory et Richard Cohen de l'équipe I2B de Matéïs, pour m'avoir permis de réaliser toutes ces expériences de Biacore, pour leur bonne humeur et leur soutien sans relâche ! Merci à Jonathan Pansieri, Pierre Mowat, Christel Marquette et Vincent Forge du CEA de Grenoble pour tout le travail effectué sur les fibres amyloïdes et l'étude de l'affinité des Nps. Merci Christel pour l'immense travail sur la publication. Je remercie Mireille Dumoulin de l'université de Liège pour m'avoir fait découvrir les pouvoirs surprenants des anticorps de chameau, merci à Jean-François Morfin et Eva Toth pour le PiB, et à Maria Joao Saraiva pour les modèles animaux. Je remercie également Eric Alléman et Nathalie Stransky-Heilkron, de l'université de Genève pour leur travail sur les nanoparticules IAPP. Je souhaite plein de réussite à l'équipe de Sébastien Mériaux, Benoit Larrat et Matthieu Gerstenmayer pour la poursuite du projet au stade *in vivo*.

Je tiens également à témoigner toute ma reconnaissance à Grégory Ramniceanu, Bich-Tuy Doan, Nathalie Mignet, Michel Bessodes et Johanne Seguin pour m'avoir permis de participer au projet de ciblage des hépatocytes.

Merci à tous les membres de l'équipe FENNEC, anciens et nouveaux, pour tous ces bons moments passés ensemble depuis mon stage de M2. Merci à Charles, j'étais ta petite stagiaire et maintenant c'est mon tour de soutenir ma thèse ! Merci à Mahmoud et à Jérémy pour la bonne humeur contagieuse, merci à Hélène pour notre amitié et tes conseils. Merci à Amandine, Shady, Albert, Laurence, Fabien, Lucie, Vu Long, Mattéo, Dalila, Christian, Arthur, Eloïse, Lionel, Florian, Anna.

Un immense merci à tous ceux que j'ai oublié de citer ici mais qui m'ont aidé et soutenu au cours de ces trois ans.

Et enfin, merci à tous mes amis (Laura, Hélène, Tranou, Gigi, Max, Jimi, Peuh, Glem, Victor, et tous les autres) merci à ma famille, à Clémence à Titou et surtout à mes parents pour m'avoir toujours soutenu pendant mes (longues) études. Merci Juju pour ton soutien, merci d'être toujours là pour moi.

RESUME

Cette thèse traite du développement de nanoparticules d'imagerie multimodale vectorisées pour détecter spécifiquement des dépôts amyloïdes ou certains récepteurs cellulaires. Ces nanoparticules, dénommées AGuIX (Activation et Guidage de l'Irradiation par rayonnement X), sont composées d'un squelette de polysiloxane fonctionnalisé par des chélates de DOTAGA(Gd^{3+}). Une fois marquées par un fluorophore organique ou des radioisotopes, ces Nps permettent de combiner jusqu'à trois techniques d'imagerie : l'IRM, qui présente une excellente résolution spatiale, et la scintigraphie et l'imagerie optique qui présentent toutes deux une excellente sensibilité. De par leur diamètre hydrodynamique inférieur à 5 nm, ces Nps sont efficacement éliminées par voie rénale et les différents tests *in vivo* réalisés n'ont pas révélé de toxicité de ces objets. Ainsi, les Nps AGuIX sont particulièrement indiquées dans le cadre d'un diagnostic précis et précoce de différentes pathologies.

L'objectif de la thèse consiste donc à greffer à la surface de ces Nps des vecteurs ciblant (i) les fibres amyloïdes ; (ii) les récepteurs asialoglycoprotéines des cellules hépatocytes du foie. Selon la nature du vecteur à greffer (i.e. molécule organique, peptide, fragment d'anticorps, ...) différentes stratégies ont été mises en place. Nous avons donc dans un premier temps optimisé les synthèses des Nps vectorisées, pour ensuite évaluer leur affinité pour leurs cibles respectives *in vitro* et/ou *in vivo*.

ABSTRACT

The goal of this PhD is to develop multimodal imaging nanoparticles vectorized for the detection of amyloid deposit or specific cells receptors. These Nps, called AGuIX (Activation and Guidance of X-Ray Irradiation) are composed of a polysiloxane network surrounded by DOTAGA(Gd^{3+}) chelates. Once labeled with an organic dye or a radioisotope, these Nps could combine three imaging techniques such as MRI, known for its outstanding spatial resolution, and optical imaging and scintigraphy, known for their strong sensitivity. Thanks to their hydrodynamic diameter below 5 nm, they are efficiently eliminated from the body through renal clearance. Thus, these Nps are particularly indicated for earlier and more accurate diagnosis of a wide range of pathologies.

To target amyloid deposits or asialoglycoproteins receptors we optimized the grafting several ligands (i.e. small molecules, peptides, antibody fragments, ...). Then, we evaluated their affinity of their respective targets *in vitro* and/or *in vivo*.

TABLES DES MATIERES

REMERCIEMENTS	3
RESUME	5
ABSTRACT	6
TABLES DES MATIERES	7
LISTE DES ABREVIATIONS	14
INTRODUCTION GENERALE	17
CHAPITRE 1: ETAT DE L'ART : NANOPARTICULES POUR DES APPLICATIONS BIOMEDICALES	20
1. ETAT DE L'ART : NANOPARTICULES POUR DES APPLICATIONS BIOMEDICALES	21
1.1. Les différentes techniques d'imagerie médicale	22
1.1.1. L'imagerie par résonance magnétique (IRM)	23
1.1.1.1. Principe de l'IRM	23
1.1.1.2. Influence des agents de contraste	24
1.1.2. La tomodensitométrie aux rayons X (TDM)	26
1.1.3. La scintigraphie	27
1.1.4. L'échographie	29
1.1.5. L'Imagerie optique	29
1.1.6. Vers une imagerie multimodale	30
1.2. Nanoparticules inorganiques pour des applications biomédicales	32
1.2.1. Les nanoparticules magnétiques	33
1.2.2. Les Nanoparticules d'Or	34
1.2.3. Les Quantum Dots	34
1.2.4. Les nanoparticules de silice	35
1.3. la Biodistribution des Nanoparticules	36
1.3.1. Influence des propriétés physicochimiques des Nps	36

1.3.2.	Ciblage passif	37
1.3.3.	Ciblage actif par l'ajout de vecteurs	38
1.3.4.	Vers une Nanoparticule Idéale	40
1.4.	Le cas de la nanoparticule AGuIX	41
1.4.1.	Un procédé top-down original	41
1.4.2.	Biocompatibilité & Biodistribution	42
1.4.3.	Une plateforme d'imagerie multimodale	43
1.4.3.1.	Un excellent agent de contraste IRM	43
1.4.3.2.	Egalement un agent d'imagerie pour la TEMP, TDM et imagerie Optique	44
1.4.3.3.	Accumulation dans les tumeurs et effet radio-sensibilisant	45
1.4.3.4.	Conclusion	46
CHAPITRE 2 :	MODIFICATION DE SURFACE DES NANOPARTICULES AGUIX	48
2.	MODIFICATION DE SURFACE DES NANOPARTICULES AGUIX	49
2.1.	Introduction	49
2.2.	Fonctions chimiques disponibles sur les AGuIX	51
2.2.1.	Proposition d'une formule Brute (Analyse élémentaire)	51
2.2.2.	Dosage des amines primaires	53
	Protocole	53
	Résultats	54
2.2.3.	Nécessité d'ajout de nouvelles fonctionnalités	55
2.3.	Ajout de fonctionnalités chimiques	57
2.3.1.	Ajout de fonctions acides carboxyliques	57
2.3.1.1.	Le couplage peptidique	57
2.3.1.1.1.	Généralités	57
2.3.1.1.2.	Activation de la fonction acide carboxylique	57
2.3.1.2.	Stratégie	59
	Protocole	60
2.3.1.3.	Caractérisations	60
2.3.2.	Ajout de fonctions thiols	65
2.3.2.1.	Ajout de thiols <i>via</i> le réactif de Traut's	65
2.3.2.1.1.	Partie expérimentale	66
2.3.2.1.2.	Caractérisations qualitatives des AGuIX@Traut's	66
2.3.2.2.	Introduction de fonctions Thiols <i>via</i> l'ajout de bras espaceurs PEG à haut poids moléculaire.	67

2.3.2.2.1.	Partie Expérimentale	67
2.3.2.2.2.	Caractérisations qualitatives des AGuIX@PEG-SH	67
2.3.2.3.	Quantification du nombre de fonctions thiol introduites	69
2.3.2.3.1.	Via le test d'Ellman	70
2.3.2.3.2.	Via l'absorption du DABMI-Maléimide.	71
2.3.2.4.	Comparaison des deux types de nanoparticules AGuIX@SH	73
2.3.3.	Conclusion	74
2.4.	Marquage fluorescent des nanoparticules	75
2.4.1.	Principe de la luminescence	75
2.4.2.	Choix du fluorophore	76
2.4.3.	Partie Expérimentale	78
2.4.3.1.	Caractérisation des AGuIX@Fluorophore	79
2.4.4.	Publication : Orotracheal administration of contrast agents : a new protocol for brain tumor targeting	81
2.4.4.1.	Introduction	81
2.4.4.2.	Publication:	84
CHAPITRE 3 :	CIBLAGE DE FIBRES AMYLOÏDES	94
3.	CIBLAGE ACTIF DE FIBRES AMYLOÏDES	95
3.1.	L'Amyloïdose : Etude Bibliographique	95
3.1.1.	La maladie d'Alzheimer	95
3.1.2.	Les pathologies amyloïdes	96
3.1.2.1.	Origines	96
3.1.2.2.	Effets de l'Amyloïdose	98
3.1.2.3.	Diagnostic et traitement d'Alzheimer : Etat des lieux	100
3.1.3.	Stratégies de ciblage des fibres amyloïdes	100
3.2.	Mesure de l'affinité des nanoparticules vectorisées pour les fibres amyloïdes par Résonance Plasmonique de Surface (SPR)	103
3.2.1.	Principe de la SPR	103
3.2.1.1.	Phénomène de réflexion totale	103
3.2.1.2.	Résonance plasmonique	104
3.2.2.	La technologie Biacore	105
3.2.2.1.	Détermination d'une constante de dissociation K_D	107
3.2.3.	Immobilisation des fibres amyloïdes	108
3.2.3.1.	Choix de la puce Biacore®	108
3.2.3.2.	Sonication préalable des fibres amyloïdes	108

3.2.3.3.	Immobilisation des fibres sur la puce	110
3.2.3.4.	Validation de la puce par le rouge congo	111
3.3.	Vectorisation par les peptides β-breaker	113
3.3.1.	Peptides β -Breaker	113
3.3.2.	Publication	115
ABSTRACT		117
INTRODUCTION		117
RESULTS AND DISCUSSION		121
Nanoparticles functionalization with targeting peptides		121
A β peptide grafted to AGuIX target specifically A β (1-42) fibrils		123
Vectorized-nanoparticles recognize A β plaques in AD mice brain		125
CONCLUSION		126
MATERIAL AND METHODS		128
Chemicals		128
Nanoparticles synthesis and functionalization		129
Relaxivity measurements		130
Dynamic Light Scattering (DLS)		130
High Performance Liquid Chromatography (HPLC)		130
Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES) analysis		131
Circular Dichroism		131
Beta-Amyloid Fibrils Growth		132
V30M-TTR amyloid fibrils growth		132
Transmission electronic microscopy		132

Binding assays	133
Surface Plasmon Resonance assays	133
Animal models	134
Immunohistochemistry and microscopy	135
<u>ACKNOWLEDGEMENTS</u>	136
<u>REFERENCES</u>	137
3.3.3. Résultats complémentaires	163
3.3.3.1. Validation du couplage des peptides sur les nanoparticules AGuIX@Peptides	163
3.3.3.1.1. Caractérisations qualitatives	163
3.3.3.2. Quantification du nombre de peptides	165
3.3.3.2.1. Dichroïsme circulaire	165
3.3.3.2.2. Proposition d'une formule brute	167
3.3.3.3. Mesure de l'affinité des nanoparticules par résonance plasmonique de surface	168
3.3.3.4. Comportement ex vivo des AGuIX@PEG@Peptides sur des coupes de cerveau de souris modèle	172
3.4. Vectorisation par le Pittsburgh Compound B	175
3.4.1. Thioflavine T & Pittsburgh Compound B	175
3.4.2. Partie expérimentale	177
3.4.2.1. Validation de la fonctionnalisation des AGuIX@PEG par le Pittsburgh compound B	177
3.4.2.1.1. Caractérisations qualitatives	178
3.4.2.1.2. Quantification du Pittsburgh compound B	181
3.4.2.1.2.1. Via les propriétés de luminescence du PIB	181
3.4.2.1.2.2. Proposition d'une formule brute	183
3.4.2.2. Mesure de l'affinité du PIB et des AGuIX@PIB par fluorescence	184
3.4.2.3. Mesure de l'affinité des AGuIX@peg@pib pour les Fibres ABeta par résonance plasmonique de surface	187
3.4.2.4. Test de l'affinité <i>ex vivo</i> des AGuIX@PEG@PIB sur des coupes de cerveau de souris modèle	188
3.5. Vectorisation par le nanobody B10Ap	191
3.5.1. Nanobodies	191
3.5.2. Greffage du nanobody sur les nanoparticules AGuIX	192
3.5.3. Caractérisations physicochimiques	193
3.5.3.1. Augmentation du diamètre hydrodynamique	194
3.5.3.2. Estimation de la concentration en B10Ap par absorbance	194

3.5.3.3.	Estimation de la concentration en B10Ap par SDS-PAGE	195
3.5.4.	Abilité du B10Ap et des Nanoparticules AGuIX@B10Ap de se lier aux fibres amyloïdes (DOT BLOT)	196
3.5.5.	Mesure de l'affinité par résonance plasmonique de surface	200
3.6.	Comparaison des stratégies _ Perspectives	202
CHAPITRE 4: CIBLAGE DE CELLULES HEPATOCYTES		206
4.	CHAPITRE 4: CIBLAGE DE CELLULES HEPATOCYTES	208
4.1.	Ciblage de cellules hépatocytes par le lactose	208
4.2.	Deux voies de greffage du lactose	210
4.2.1.	Greffage du lactose-o-éthylamine sur les AGuIX@PEG ₂₅₀ -COOH	210
4.2.1.1.	Protocole	210
4.2.1.2.	Caractérisations qualitatives	211
4.2.2.	Greffage du lactose-maléimide sur les AGuIX@PEG ₂₁₀₀ -SH	212
4.2.2.1.	Protocole	212
4.2.2.2.	Caractérisations qualitatives	212
4.3.	Etude de la biodistribution des nanoparticules par IRM	215
4.3.1.	Bilan cinétique des captures rénales et hépatiques	215
4.3.2.	Influence du greffage des chaîne de PEG ₂₁₀₀ -SH	217
4.3.3.	Influence du greffage du dérivé Lactose sur la biodistribution hépatique.	218
4.4.	Conclusion	218
CONCLUSION GENERALE		219
CONCLUSION GENERALE		220
REFERENCES		223
ANNEXE 1: PROTOCOLE DE SYNTHÈSE DES NPS AGUIX		245
ANNEXE 2 : DROITE ETALON DE L'ABSORBANCE ET DE LA FLUORESCENCE DU PIB DANS L'ETHANOL ET LE DMSO		246

ANNEXE 3 : PROTOCOLE DE DOSAGE DU B10AP PAR SDS-PAGE	248
RESUME	249
ABSTRACT	249

LISTE DES ABREVIATIONS

a.a. : acide aminé

AD : Maladie d'Alzheimer

AFFOND : Amyloïde: des FOLDopathies au NanoDesign

AGuIX : Activation et Guidage de l'irradiation par rayons-X

AMM : Autorisation de mise sur le marché

AP : Phosphatase Alcaline

APTES : (3-aminopropyl)triéthoxysilane

ASGP-R : Récepteur d'asialoglycoprotéine

AuNp : Nanoparticules d'or

B10Ap : conjugaison du nanobody B10 et de la phosphatase alcaline

BCIP : 5-bromo-4-chloro-3-indolye

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

-COOH : acide carboxylique

Cy5,5 : cyanine 5,5

Da : Dalton

DABMI : 4-Diméthylaminophénylazophényl-4'-maleimide

DEG : Diéthylène glycol

D_H : Diamètre Hydrodynamique

DLS : Diffusion dynamique de la lumière

DMF : Diméthylformamide

DMSO : diméthylsulfoxyde

DOTA : acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique

DOTAGa : acide 2,2',2''-(10-(2,6-dioxotétrahydro-2H-pyran-3-yl)-1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7-triyl)triacétique

DTNB : acide 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque)

DTPA : acide diéthylène triamine penta acétique

DC : Dichroïsme circulaire

ε : Coefficient d'extinction molaire (cm⁻¹.L⁻¹)

EDC : chlorhydrate de N-(3-diméthylaminopropyl) - N'-éthylcarbodiimide

EDTA : Éthylène Diamine Tétracétique

EPR : Enhanced Permeability and Retention

FC : Canal de la puce Biacore®

FDA : Food and Drug Administration

18-FDG : Fluorodésoxyglucose (18F)

FITC : Isothiocyanate de fluorescéine

FNS : Fibrose Néphrogénique Systémique

FTIR : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

Gd₂O₃ : oxyde de gadolinium

GMP: Good Manufacturing Practice

HBS-P : tampon contenant 0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.005% v/v Surfactant P20

HNp : *p*-nitrophénol

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance

ICA : Agents de contraste iodés

ICP-OES : Spectrométrie par torche à plasma

ILM : Institut Lumière Matière

IRM : Imagerie à Résonance Magnétique

ISA : Institut des Sciences Analytiques

K_d : Constante de dissociation (M)

K_{st} : Constante de stabilité thermodynamique

KLVFF : Lysine-Leucine-Valine-Phénylalanine-Phénylalanine

λ : Longueur d'onde (nm)

LPFFD : Leucine-Proline-Phénylalanine-Phénylalanine-Acide aspartique

LSPR : Résonance Plasmonique de Surface Localisée

MET : Microscopie électronique en transmission

MRP : Médicament radiopharmaceutique

Mn : Masse molaire moyenne

MSNP : Nanoparticules de silice mésoporeuses

Nb : Nanobody

NBT : bleu de nitro tetrazolium

NET : Noir ériochrome T

-NH₂ : amine primaire

NHS : N-hydroxysuccinimide

NMRD : Relaxation de Résonance Magnétique Nucléaire

Np(s) : Nanoparticule(s)

θ_{SPR} : angle spécifique pour lequel se produit une résonance plasmonique de surface

PBS : Tampon phosphate salin

PEG : polyéthylène glycol

PFP : pentafluorophénol

QD : Quantum Dot

RC : Rouge Congo

RES : Système Réticulo-Endothélial

RhoB : Isothiocyanate de rhodamine B

r_i : vitesse de relaxation

rpm : rotation par minute

R.U. : Unité de résonance

RX : Rayons X

SDS : Sodium dodécyl sulfate

SiO_{1.5}aminopropyl : fragment issu de l'hydrolyse-condensation de l'APTES

SiO₂ : dioxyde de silicium

SPION : Nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques

SPR : Résonance Plasmonique de surface

t_{1/2} : temps de demi-vie

TCEP : tris(2-carboxyéthyl)phosphine

TDM : Tomodensitométrie

TEMP : Tomographie par Emission Mono-Photonique

TEOS : Tetraéthyl orthosilicate

TEP : Tomographie à émission de positon

ThS : Thioflavine S

ThT : Thioflavine T

T_i : Temps de relaxation

TNBS : acide 2,4,6 trinitrobenzènesulfonique

t_r : temps de rétention

US : Ultrasons

USPIO : Nanoparticules d'oxyde de fer super paramagnétiques de très petite taille

INTRODUCTION GENERALE

La médecine moderne a accompli de grands progrès au cours du siècle dernier. Si l'espérance de vie moyenne était de 45 ans en France en 1900, elle atteint désormais 78 ans pour les hommes et 85 ans pour les femmes. Ces avancées ont notamment pu être réalisées grâce aux importantes avancées technologiques du XXe siècle. Aujourd'hui les nanotechnologies apparaissent comme un des prochains sauts technologiques de notre siècle. En effet, à l'échelle du nanomètre, les matériaux présentent des propriétés inédites (i.e. réactivité de surface, propriétés magnétiques, thermiques, luminescentes) applicables dans des domaines aussi variés que l'énergie, la microélectronique, la catalyse, ...[1].

Plus particulièrement, dans le domaine de la santé, les nanotechnologies apparaissent comme un outil extrêmement prometteur. Au cours des vingt dernières années, de multiples nanoparticules organiques ou inorganiques ont été développées pour des applications en imagerie ou en thérapie. En combinant une ou plusieurs modalités d'imagerie à des modalités de thérapies, les nanoparticules ont permis l'émergence d'un nouveau paradigme de la médecine moderne : la théranostique (*thérapie + diagnostic*). Notre équipe a ainsi développé une nouvelle famille de nanoparticules : les AGuIX (Activation et Guidage de l'irradiation par rayons-X) qui permettent de combiner jusqu'à trois techniques d'imagerie médicale [2]. Ces nanoparticules sont particulièrement prometteuses dans le domaine de l'oncologie. En effet, elles s'accumulent passivement au niveau des tumeurs par effet EPR (Enhanced Permeation and Retention) [3] où elles permettent d'augmenter localement l'impact d'un traitement de radiothérapie grâce à un effet radiosensibilisant. Plusieurs expériences ont ainsi prouvé que les nanoparticules AGuIX permettaient d'augmenter la médiane de survie de souris porteuses de tumeurs [4], [5].

Comme cité ci-dessus les nanoparticules AGuIX peuvent combiner plusieurs techniques d'imagerie médicales : l'IRM, la scintigraphie, l'imagerie de fluorescence. Elles permettent ainsi d'allier des techniques présentant une excellente résolution spatiale (i.e. IRM) à l'extrême sensibilité de techniques comme la scintigraphie ou l'imagerie de fluorescence. Ainsi, ces Nps sont également très prometteuses dans le cadre du diagnostic précoce de différentes pathologies. Dans le cadre de l'ANR DIA-amy1 (EuroNanoMed) nous nous sommes intéressés à la fonctionnalisation des nanoparticules AGuIX par différents vecteurs ciblant les fibres amyloïdes. Ce projet interdisciplinaire est réalisé en partenariat avec différentes équipes européennes. Les pathologies amyloïdes sont causées par l'agrégation de protéines en plaques insolubles dans le milieu extracellulaire. Selon les protéines à l'origine des agrégats ou selon leur zone de déposition, ce processus donne lieu à l'apparition de

différentes affections, dont la plus connue est la maladie d'Alzheimer (AD). Trois stratégies de ciblage des dépôts amyloïdes ont été développées au cours de la thèse.

La première fait appel à des pentapeptides dont la séquence d'acides aminés est directement inspirée de la protéine à l'origine de la pathologie. Ces peptides, appelés *Beta-breaker*, ont montré la propriété de s'assembler aux motifs amyloïdes et d'empêcher leur évolution en fibres matures [6], [7]. La seconde stratégie consiste à greffer à la surface des Nps une molécule organique insaturée, le Pittsburgh Compound B, développé initialement comme marqueur TEP des fibres A β chez le patient atteint de la maladie d'Alzheimer [8]. Enfin, la dernière stratégie mise en place au cours de la thèse utilise des fragments d'anticorps de camélidés ou *nanobodies*. Plus particulièrement, le nanobody B10 couplé à phosphatase alcaline présente une très forte affinité pour les structures en fibres ou protofilaments des dépôts amyloïdes [9].

Ainsi, dans un premier temps, mon travail de thèse consiste au développement des différentes voies de synthèse des Nps vectorisées. Dans un second temps, nous évaluerons le potentiel ciblant de ces Nps *in vitro* grâce à la résonance plasmonique de surface et la fluorescence et *ex vivo* grâce à la réalisation d'expériences d'histologie.

Le second projet réalisé au cours de la thèse consiste à fonctionnaliser les nanoparticules AGuIX afin de cibler spécifiquement les récepteurs asialoglycoprotéines (ASGP-R) des cellules hépatocytes du foie. L'objectif final est de pouvoir évaluer la fonction hépatique, directement corrélée au nombre d'ASGP-R, de manière non invasive grâce aux propriétés d'imagerie des nanoparticules AGuIX (IRM et imagerie de fluorescence).

Ainsi dans ce manuscrit, je présenterai dans un premier temps les différentes modalités d'imagerie médicale, ainsi que les principales familles de nanoparticules inorganiques développées pour des applications en imagerie ou en thérapie, et plus particulièrement les nanoparticules AGuIX.

Dans un second temps, je m'intéresserai aux différentes modifications de surface réalisées à la surface des Nps AGuIX. Le but de ces modifications étant d'introduire à leur surface (i) des fonctions chimiques adaptées au greffage covalent des différents ligands ciblants (ii) des fluorophores organiques.

Le troisième chapitre sera consacré aux différentes stratégies de ciblage des fibres amyloïdes. Après avoir explicité la synthèse et la caractérisation de ces Nps, nous évaluerons leur capacité à cibler les fibres notamment grâce à la résonance plasmonique de surface.

Enfin, le quatrième chapitre traite du ciblage des récepteurs asialoglycoprotéines des cellules hépatocytes du foie. Plus particulièrement, nous suivrons la biodistribution des nanoparticules AGuIX par IRM. Nous étudierons notamment l'influence du greffage de chaînes de polyéthylène glycol (PEG) à la surface des Nps, et de leur vectorisation par un dérivé lactosylé.

CHAPITRE 1: ETAT DE L'ART : NANOPARTICULES POUR DES APPLICATIONS BIOMEDICALES

1. ETAT DE L'ART : NANOPARTICULES POUR DES APPLICATIONS BIOMEDICALES

Il y a quelques dizaines d'années, l'amélioration des techniques d'analyses chimiques, notamment l'invention du microscope à effet tunnel en 1981, a permis l'observation de la matière à l'échelle du nanomètre. Certains nano-objets étudiés ont alors montré de nouvelles propriétés en comparaison aux matériaux massifs. Certaines de ces propriétés viennent du fait que le ratio surface sur volume augmente lorsque la taille d'un objet diminue. Etant donné que de nombreuses réactions chimiques se produisent en surface, les nanoparticules présentent ainsi une réactivité beaucoup plus importante que celles des matériaux massifs correspondant. Mais cette échelle de taille permet également l'apparition de nouveaux phénomènes quantiques ou thermiques.

Ainsi, les nanoparticules (Nps), définies comme un objet ayant au moins une de ses trois dimensions comprises entre 1 et 100 nanomètres, ont rapidement émergé dans de multiples domaines d'applications tels que la microélectronique, l'environnement, l'énergie ou encore dans le domaine de la biologie et la médecine [1]. Le recours aux nanotechnologies dans ces deux derniers domaines d'applications représente une révolution dans l'élaboration de nouveaux diagnostics ou traitements ou dans une meilleure compréhension des phénomènes biologiques. Depuis plusieurs années, d'intenses recherches ont été menées afin de développer des nanoparticules permettant de conjuguer une ou plusieurs techniques d'imagerie et de thérapie.

Dans le cadre de ce travail de thèse, je me suis intéressée plus particulièrement aux nanoparticules d'imagerie multimodale AGuIX. L'objectif recherché est de fonctionnaliser ces Nps par différents vecteurs afin de cibler spécifiquement certaines pathologies ou certains organes.

Au cours de ce chapitre d'introduction bibliographique, je présenterai tout d'abord les avantages et limitations des différentes techniques d'imagerie médicale. Dans un second temps, les principales familles de nanoparticules développées pour des applications en imagerie et en thérapie, ainsi que les différentes stratégies pour moduler leurs comportements *in vivo* seront exposées. Enfin, la dernière partie de ce chapitre traitera des nanoparticules AGuIX afin d'explicitier pourquoi ces Nps sont particulièrement prometteuses comme plateforme d'imagerie multimodale et agent théranostique.

1.1. LES DIFFERENTES TECHNIQUES D'IMAGERIE MEDICALE

Plusieurs modalités d'imagerie médicale sont à disposition du chercheur et du clinicien. Elles permettent d'imager le corps humain *via* différentes techniques: (i) l'imagerie par résonance magnétique (IRM), la scintigraphie (ii) par émission monophotonique (TEMP) et (iii) par émission de positon (TEP), (iv) la tomodensitométrie (TDM), (v) l'échographie (US) et enfin (vi) l'imagerie optique [10].



Figure 1-1: Coupe transversale de cerveau humain (haut), observée par différentes modalités d'imagerie (bas) de gauche à droite : TDM, IRM, TEMP et TEP [10].

Chacune de ces techniques présente des avantages et des limitations selon sa sensibilité, sa résolution, sa profondeur de détection dans les tissus ou encore son coût (Tableau 1-1) (Figure1--1) [11].

Tableau 1-1 : Caractéristique des différentes modalités d'imagerie [11].

Modalité d'imagerie	Signal détecté	Temps d'acquisition	Exemples d'agents de contraste	Résolution spatiale	Sensibilité (mol.L ⁻¹)	Coût
IRM	RMN du proton (¹ H)	Min/Heures	Complexes paramagnétiques ou particules ferromagnétiques	10-100 µm	10 ⁻³ à 10 ⁻⁵	€€
TEMP	Photon γ	Min/Heures	Eléments radiomarqués (^{99m} Tc, ¹¹¹ In, ²⁰¹ Tl...)	0,5-2 mm	10 ⁻¹⁰ à 10 ⁻¹⁴	€€€
TEP	Paire de photons γ	Min/Heures	Eléments radiomarqués (¹⁸ F, ¹¹ C, ¹⁵ O, ⁶⁴ Cu, ⁶⁸ Ga...)	1-2 mm	10 ⁻¹⁰ à 10 ⁻¹⁵	€€€€
TDM	Rayonnement X	Min	Molécules iodées	50 µm	10 ⁻³ à 10 ⁻⁶	€€
US	Ondes Ultrasonores	Sec/Min	Microbulles de gaz	50-500 µm	10 ⁻⁵ à 10 ⁻⁸	€
Imagerie Optique	Lumière visible ou proche infrarouge	Sec/Min	Fluorophores émettant dans le visible ou dans le proche infrarouge	1-3 mm	10 ⁻⁹ à 10 ⁻¹²	€€

1.1.1. L'IMAGERIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE (IRM)

1.1.1.1. PRINCIPE DE L'IRM

L'IRM repose sur le principe de la résonance magnétique nucléaire et consiste à étudier la relaxation des moments magnétiques des spins des atomes d'hydrogène contenus dans l'organisme [12]. Environ 63% du corps humain est constitué d'hydrogène, présent notamment dans l'eau ou dans les tissus adipeux.

Lorsque les molécules d'eau sont soumises à l'influence d'un champ magnétique (B_0), leurs moments magnétiques de spin (μ) s'alignent selon ce champ en décrivant un cône autour de cet axe, c'est le mouvement de précession. La vitesse de précession est proportionnelle à l'intensité du champ magnétique B_0 et est caractérisée par sa fréquence ω_0 (fréquence de Larmor) selon l'équation $\omega_0 = \gamma B_0$ [13], où γ est le rapport gyromagnétique.

Une perturbation de cet alignement des spins est induite par une impulsion sous la forme d'un champ magnétique B_1 perpendiculaire au champ B_0 (Figure 1-1) [12].

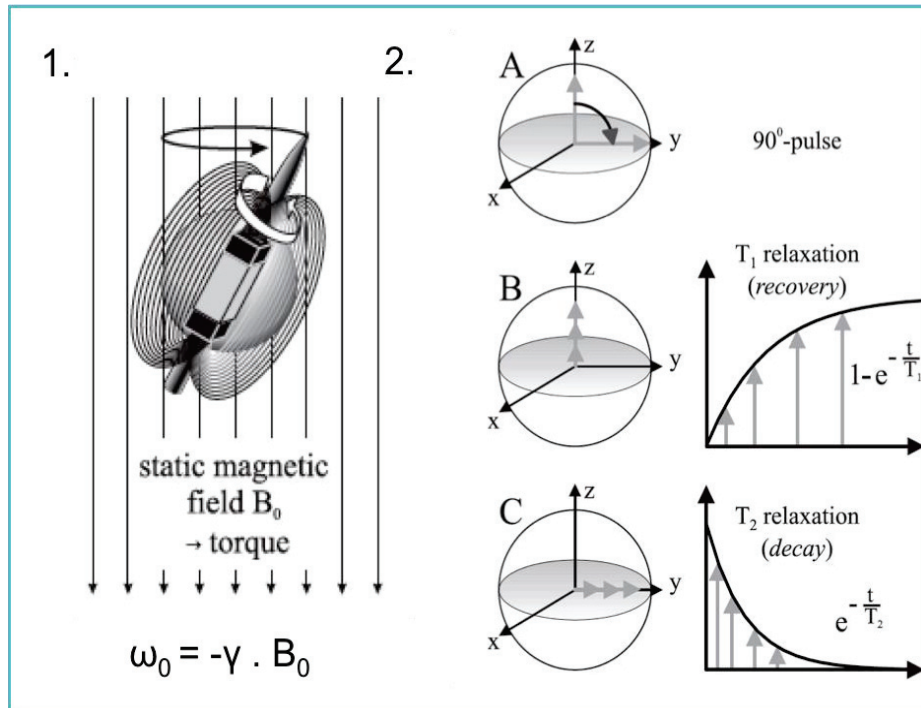


Figure 1-1 : Principe de l'IRM. 1) Les spins des atomes d'hydrogène s'alignent parallèlement au champ magnétique constant B_0 . 2) A. Impulsion de fréquence radio dans le plan transversal perpendiculaire au champ magnétique B_0 (xy). Après cette impulsion, les spins se réalignent selon le champ magnétique B_0 B. selon la composante z : relaxation longitudinale T_1 ; C. selon la composante xy : relaxation transversale T_2 . Adapté de [12].

Lors de leur retour à l'état d'équilibre, les protons restituent l'énergie sous la forme d'un signal radiofréquence mesurable, à l'origine du contraste observé sur les clichés IRM. Lorsque ce signal est mesuré selon l'axe z , aligné sur le champ magnétique B_0 , il s'agit de la relaxation longitudinale T_1 . Lorsque ce signal est mesuré selon le plan xy perpendiculaire à ce champ, on parle de relaxation transversale T_2 . Les protons des différents tissus du corps (contenus dans l'eau ou les tissus adipeux) ne présenteront pas la même relaxation, permettant ainsi d'obtenir un contraste en niveau de gris des différents constituants de l'organisme.

1.1.1.2. INFLUENCE DES AGENTS DE CONTRASTE

L'IRM présente de nombreux avantages : c'est une technique d'imagerie non invasive, qui ne fait pas appel à des rayonnements ionisants et qui offre une très bonne résolution spatiale (de 10 à 100 μm). Cette technique souffre toutefois d'une mauvaise sensibilité et ne permet pas toujours de différencier les tissus observés. Pour pallier ces problèmes, il est possible d'utiliser des composés permettant de rehausser le contraste en réduisant le temps de relaxation des protons de leur voisinage. L'efficacité d'un agent de contraste dépend de sa vitesse de relaxation ou relaxivité r_i (en $\text{s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$), inversement proportionnelle au temps de relaxation T_i (s) selon l'équation :

$$\frac{1}{T_{i(\text{mesuré})}} = \frac{1}{T_{i(\text{eau})}} + r_i \cdot [M]$$

où [M] correspond à la concentration (mM) en agent de contraste et i, égal à 1 ou 2, au processus de relaxation longitudinal (T_1) ou transversal (T_2).

La première famille d'agents de contraste, appelés « agents de contraste positifs » est constituée de complexes paramagnétiques qui influent sur le temps de relaxation longitudinal T_1 . Les complexes de gadolinium sont les plus couramment utilisés. En effet, avec son spin de $\frac{7}{2}$, le Gd^{3+} possède un grand moment magnétique μ et un temps de relaxation de ses spins électroniques suffisamment long pour influencer sur ceux des molécules d'eau. En clinique, plusieurs complexes de gadolinium sont utilisés, notamment le DOTAREM® (Gd-DOTA) et le Magnevist® (Gd-DTPA) [14], (Figure 1-2). Le principal risque de toxicité de ces agents de contraste concerne l'éventuel relargage d'ions Gd^{3+} libre dans l'organisme.

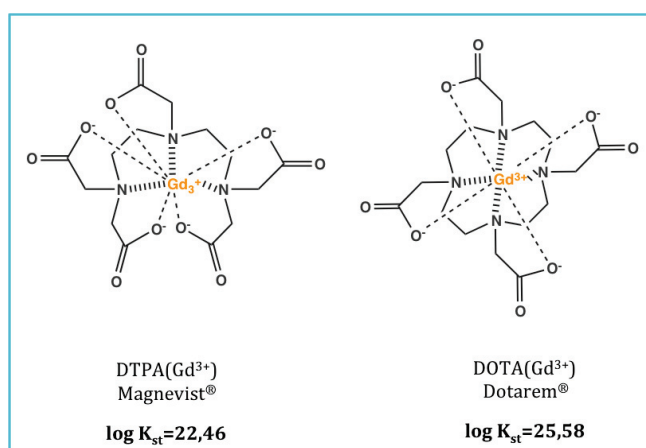


Figure 1-2 : Constantes de stabilité thermodynamique des complexes DTPA(Gd), DOTA(Gd). (Données issues de Sherry *et al.* ; 2009 [17])

En effet, les ions Gd^{3+} libres sont hautement toxiques et peuvent générer une fibrose néphrogénique systémique (FNS) chez les patients, en particulier chez ceux souffrant d'une insuffisance rénale [15]. Cette maladie affecte particulièrement la peau, mais peut également s'étendre à d'autres organes et provoquer à terme le décès du patient. L'influence de certains agents de contraste à base de chélates acycliques concernant l'apparition de NFS a été avéré [16].

Afin d'éviter le relargage d'ions Gd^{3+} dans l'organisme, il est important de choisir des complexes de gadolinium présentant la constante de stabilité thermodynamique K_{st} la plus élevée possible, définie selon l'équation :

$$K_{st} = \frac{[ML]}{[M][L]}$$

où M est l'ion métallique, ici le Gd^{3+} , L est le ligand de coordination, et ML le complexe formé par le ligand et l'ion métallique.

En comparaison avec les agents de contraste composés de chélatants acycliques tel que DTPA, les chélatants macrocycliques tels que le DOTA n'ont pas été liés à l'apparition de fibrose néphrogénique systémique. Cette innocuité s'explique tout d'abord par la constante de stabilité thermodynamique du complexe DOTA(Gd^{3+}) ($\log K_{st} = 25,58$) qui est supérieure de plusieurs ordres à celle du DTPA(Gd^{3+}) ($\log K_{st} = 22,46$) (Figure 1-2). De plus, les cinétiques de complexation et décomplexation du Gd^{3+} sont beaucoup plus lentes dans le cas du DOTA(Gd^{3+}). Par exemple, le temps de demi-vie ($t_{1/2}$) de décomplexation du Gd^{3+} en milieu acide fort ($pH = 1$) est de 9,6 min pour le DTPA(Gd^{3+}) et de 9,2 heures pour le DOTA(Gd^{3+}) [17]. Ainsi, un ion Gd^{3+} chélaté par un ligand DOTA sera très stable et ne risquera pas de se décomplexer et d'être relargué dans l'organisme.

Historiquement, les stratégies d'optimisation de la vitesse de relaxation r_1 de ces agents de contraste positifs consistent à jouer sur la nature du chélate ou son mode de coordination. Depuis quelques années, une nouvelle voie d'amélioration consiste à greffer les complexes de Gd^{3+} sur une structure macromoléculaire. Cette stratégie sera explicitée à travers l'exemple des nanoparticules AGuIX (voir § 1.4).

La deuxième famille d'agents de contraste, appelés « agents de contraste négatifs » influence le temps de relaxation transversal T_2 et est constituée de particules superparamagnétiques qui seront détaillées ultérieurement dans le manuscrit (voir §1.2).

1.1.2. LA TOMODENSIMETRIE AUX RAYONS X (TDM)

La tomodensimétrie, ou plus communément appelé « scanner », permet la réalisation d'images 2D ou 3D à partir de la mesure de l'absorption des rayons X par les tissus. Concrètement, un émetteur de rayons X effectue une rotation autour d'un patient tandis qu'un récepteur, situé en face, mesure l'intensité des rayons partiellement absorbés lors de leur passage dans les tissus. Plus un matériau est dense et plus son numéro atomique est élevé, plus il absorbera les rayons X. Ainsi, le coefficient d'absorption des RX est décrit selon la formule suivante :

$$\mu = \frac{\rho Z^4}{AE^3}$$

où ρ représente la densité du matériau, Z le numéro atomique, A la masse atomique des éléments qui le compose, et E l'énergie des rayons X. Ainsi, les os, seront particulièrement bien détectés en « blanc brillant » tandis que les tissus mous apparaitront sous forme de nuance de gris.

Tout comme l'IRM, cette technique permet une excellente résolution mais souffre d'une faible sensibilité qui peut être améliorée grâce à l'utilisation d'agents d'imagerie. Avec son numéro atomique élevé ($Z = 53$), l'iode absorbe fortement les rayons X. En clinique, on retrouve de nombreux « iodinated contrast agents » ou ICAs qui se présentent sous la forme de molécules aromatiques iodées [18] monomériques ou dimériques, et chargées ou non (Figure 1-3).

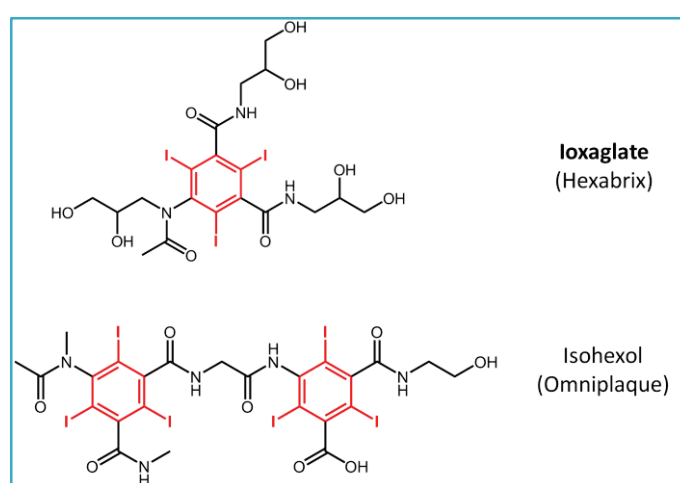


Figure 1-3 : Exemples de deux ICA couramment utilisés en clinique (Ioxaglate : monomère non chargé et Isohexol : dimère ionique) [18].

La principale limitation quant à l'utilisation d'ICAs en clinique vient du nombre important de patients présentant des réactions secondaires après l'injection de ces agents de contraste. Ces effets, semblables à des réactions allergiques, peuvent aller de rougeurs cutanées à des troubles cardiorespiratoires et affectent 3% des patients dans le cas des molécules non chargées et 15% des patients dans le cas des molécules ioniques [18].

Dernièrement, les nanoparticules constituées d'éléments lourds (ex : nanoparticules d'or, de fer, ...) ont montré un fort potentiel comme futurs agents de contraste en TDM de par leur densité et le numéro atomique élevé des atomes les constituant.

1.1.3. LA SCINTIGRAPHIE

La scintigraphie est une méthode d'imagerie médicale du domaine de la médecine nucléaire basée sur l'injection de traceurs radioactifs. Le développement de ces traceurs dans les années 1920 par le radiochimiste George de Havesy, lui a valu d'être récompensé par le prix Nobel de Chimie en 1943.

En pratique, des images fonctionnelles sont produites à partir des rayonnements de médicament radiopharmaceutiques (MRP) administrés chez le patient et détectés par des gamma-caméras. Deux types d'imagerie nucléaires sont actuellement disponibles pour le clinicien : la tomographie d'émission monophotonique (TEMP) et la tomographie par émission de positons (TEP).

La TEMP permet d'obtenir des images à partir des rayonnements gamma émis par des radio-isotopes (ou radionucléides) injectés chez le patient. Ces rayons sont ensuite collectés à l'aide de gamma-caméras. Les isotopes les plus couramment utilisés en cliniques sont le technécium-99m ($t_{1/2} = 6$ heures), l'iode-123 ($t_{1/2} = 13,2$ heures), l'indium-111 ($t_{1/2} = 2,8$ jours) et le gallium-67 ($t_{1/2} = 3,3$ jours) [19]. Selon le phénomène biologique à observer, des isotopes avec des temps de demi-vie plus ou moins long pourront être utilisés ; l'idéal étant de sélectionner des isotopes aux courts $t_{1/2}$, tel que technétium, afin de limiter l'exposition du patient aux radiations. Toutefois, selon le phénomène à observer, des isotopes aux longs temps de demi-vie peuvent être préférés. Par exemple, le gallium, se lie principalement aux globules blancs et est donc très utile dans le cas du diagnostic d'une infection [20].

La TEP, quant à elle, est une technique d'imagerie qui fait appel à des composés radiomarqués par des isotopes émettant des positons tel que l'oxygène (^{14}O et ^{15}O), l'azote (^{13}N) ou le carbone (^{11}C). L'hydrogène ne possédant pas d'isotope émetteur de positons, cet élément est généralement substitué par du fluor (^{18}F). L'intérêt est de radiomarquer des composés permettant d'imager des tissus ou phénomènes biologiques spécifiques. Plus de 500 sondes moléculaires ont été développées et consistent en plusieurs anticorps, peptides, enzymes ou oligonucléotides [21]. Par exemple, le 2-[F-18]fluoro-2-déoxy-D-glucose (FDG) est un analogue du glucose couramment utilisé. Il permet notamment de mesurer le métabolisme de nombreux organes tels que le cerveau, les poumons ou le cœur, il s'accumule préférentiellement dans les tumeurs et permet même de corroborer un diagnostic de la maladie d'Alzheimer.

Ces deux techniques de scintigraphie se distinguent par leurs sensibilités (de 10^{-10} à 10^{-14} mol.L $^{-1}$ pour la TEMP et 10^{-10} à 10^{-15} mol.L $^{-1}$ pour la TEP), mais présentent une faible résolution. Celle-ci est toutefois meilleure dans le cas de la TEMP (0,5-2mm) que pour la TEP (1-2 mm). La TEMP est également moins onéreuse, et permet, dans certains cas, d'utiliser des MRP aux longs temps de demi-vie comme le gallium-68. La TEP, 10 fois plus sensible, permet de visualiser des processus biologiques spécifiques grâce au radiomarquage de biomarqueurs comme des anticorps. Le choix entre les deux techniques s'effectue au cas par cas selon la pathologie ou la zone à étudier [22].

1.1.4. L'ECHOGRAPHIE

L'échographie fait appel aux ondes acoustiques à haute fréquence (2-20 MHz) appliquées sur une région anatomique d'intérêt. Ces ultrasons sont partiellement réfléchis par les organes en fonction de leur densité ou de leur « indépendance acoustique », analysés par un transducteur et transformés en images [23]. La résolution spatiale des images obtenues est fonction de la fréquence des ondes acoustiques qui peut atteindre jusqu'à 60 MHz. Seulement, cette augmentation de la résolution se fait au détriment de la pénétration des ondes dans les tissus et ne permet pas d'observer les zones les plus « profondes » de l'organisme. Le contraste des images obtenues par cette technique peut être amélioré grâce à l'utilisation de microbulles comme agents de contraste [24].

1.1.5. L'IMAGERIE OPTIQUE

L'imagerie optique implique l'utilisation d'agents d'imagerie luminescents, et contrairement aux autres techniques décrites, elle n'est utilisée aujourd'hui que dans le cadre de la recherche préclinique. Cette technique a une sensibilité de l'ordre du nano ou picomolaire et présente l'avantage, contrairement aux techniques de tomographie, de faire appel à une activation *via* un rayonnement lumineux et non *via* un rayonnement ionisant. Elle est toutefois limitée par la faible pénétration des rayons lumineux dans les tissus.

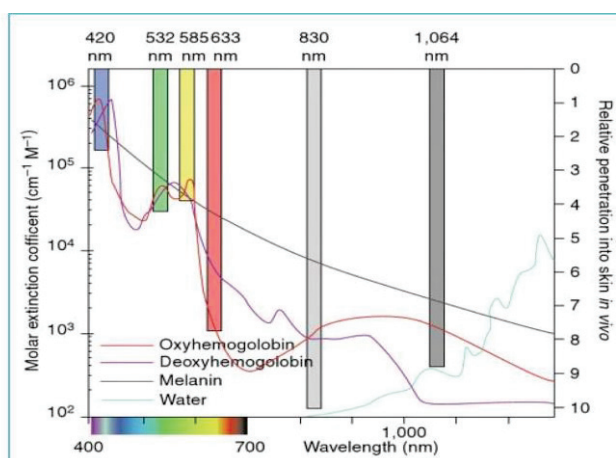


Figure 1-4: Profondeur relative de la pénétration dans les tissus de longueurs d'ondes dans le visible et le proche infra-rouge (axe droit) superposée aux spectres d'absorption des chromophores biologiques: le sang, la mélanine et l'eau.

(Handbook of lasers in dermatology ; [25]).

En effet, la pénétration de la lumière dans les tissus varie en fonction de la longueur d'onde. Plusieurs composants du corps humain sont responsables de cette absorption des rayons lumineux, notamment la mélanine, l'hémoglobine ou l'eau [25] (Figure 1-4). Entre 650 et 900 nm, l'absorption relative et l'autofluorescence de ces molécules sont minimales. Cette plage de longueur d'onde constitue donc une fenêtre optique idéale pour l'imagerie de fluorescence. De nombreux agents

d'imagerie absorbant et émettant dans le visible et le proche infra-rouge ont ainsi été développés [26], [27] (Tableau 1-2). Parmi ceux-ci, la fluorescéine ($\lambda_{\text{abs}}=495$ nm) et l'indocyanine green ($\lambda_{\text{abs}}=780$ nm) ont obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM).

Tableau 1-2 : Longueur d'onde d'excitation et d'émission de fluorophores courants.

Fluorophore	Longueur d'onde d'excitation (nm)	Longueur d'onde d'émission (nm)
Fluorescéine	495	517
Rhodamine B	543	565
Cyanine 5,5	675	694
ZW800	772	788
Indocyanine green	780	820

Pour l'instant, l'imagerie optique est restreinte à l'imagerie du petit animal ou l'étude préclinique des lésions superficielles chez l'humain. L'utilisation de fibres optiques peut permettre d'observer la fluorescence de ces composés *in vivo* en s'affranchissant de l'absorption de la lumière par la peau [28]. Cette technique s'avère très utile dans le cas d'ablation de tumeurs afin de distinguer les zones saines des zones malades après une accumulation spécifique du fluorophore dans les zones malignes.

Un des principaux axes de développement de l'imagerie de fluorescence consiste, comme pour la TEP, à marquer des vecteurs spécifiques afin de suivre leur comportement *in vivo*. Cette modalité d'imagerie est particulièrement adaptée à la recherche clinique chez le petit animal. En comparaison à la TEP, celle-ci est beaucoup plus facile à mettre en place pour le chercheur et ne présente pas de risques liés à l'exposition aux rayonnements ionisants ou aux produits radioactifs.

1.1.6. VERS UNE IMAGERIE MULTIMODALE

Chacune des modalités d'imagerie médicale présente des atouts et des limitations. Comme nous venons de le voir, aucune technique ne permet d'allier à elle seule une haute sensibilité avec une haute résolution. La combinaison de plusieurs techniques d'imagerie médicale sur une même plateforme permettrait de pallier leurs défauts respectifs et représenterait donc un immense intérêt dans l'amélioration du diagnostic médical.

Afin d'éviter au patient de réaliser plusieurs analyses distinctes dans une journée et de garantir une bonne cohérence spatiale et temporelle entre les images, la meilleure solution serait de réaliser

simultanément les acquisitions. Pour répondre à cet enjeu, plusieurs plateformes d'imagerie multimodales, alliant sensibilité et résolution ont été développées.

Dès la fin des années 1990, les premières plateformes combinant TEMP/TDM et TEP/TDM ont été développées et sont actuellement utilisées en clinique pour des applications en cardiologie, en neurologie ou en oncologie. Elles permettent notamment de détecter et de localiser précisément la présence de cellules tumorales en offrant un diagnostic beaucoup plus fiable que dans le cas de deux analyses distinctes [29]. La combinaison de techniques de scintigraphie couplées aux rayons X expose toutefois le patient à une dose de rayonnement non négligeable (jusqu'à 25 mSv dans le cas de la TEP/TDM [30]). En 2010, les premiers appareils combinant TEP et IRM pour l'imagerie corporelle ont été construits par Philips. Ils permettent de combiner un excellent contraste avec des informations 3D fonctionnelles et promettent de grandes avancées dans le domaine de la neurologie [31]. Seulement, ces deux techniques peuvent provoquer des interférences mutuelles et leur coût de développement est particulièrement élevé [32],[33]. Face aux grands progrès permis par la combinaison de plusieurs techniques, des plateformes combinant US/IRM, Fluo/TEP, TEMP/IRM et Fluo/IRM sont actuellement en cours de développement. Des plateformes combinant imagerie optique et IRM ont ainsi été construites pour l'imagerie du petit animal [34], elles permettent d'associer des images fonctionnelles d'une grande sensibilité obtenues par fluorescence à la résolution de l'IRM, sans recourir à des rayonnements ionisants et sans provoquer d'interférences mutuelles.

Deux agents d'imagerie complémentaires peuvent être utilisés lors d'une imagerie bimodale, néanmoins, ils peuvent ne pas avoir la même biodistribution ou la même pharmacocinétique. L'utilisation de nanoparticules comme sondes multimodales permet de pallier ces problèmes et d'assurer une co-localisation du signal [35]. Ainsi, depuis une quinzaine d'années, d'intenses recherches ont été effectuées afin de proposer des nanoparticules combinant i) plusieurs modalités d'imagerie médicale, ii) une ou plusieurs modalités d'imagerie et de thérapie, iii) plusieurs modalités de thérapie.

1.2. NANOPARTICULES INORGANIQUES POUR DES APPLICATIONS BIOMÉDICALES

Le développement de nanoparticules appliquées à la biologie et la médecine est aujourd'hui un domaine en pleine expansion qui tente de répondre aux enjeux de la médecine du XXI^e siècle, tel que l'émergence de diagnostics plus précoces et plus précis des maladies, ou de traitements personnalisés.

Par exemple, dans le domaine de l'oncologie, des nanoplateformes combinant plusieurs techniques d'imagerie et/ou de thérapie peuvent permettre : i) d'obtenir un diagnostic plus précoce et plus précis du développement tumoral, ii) de réduire le ratio bénéfice/risque d'un traitement de chimiothérapie grâce à une délivrance ciblée du médicament, iii) d'améliorer l'efficacité d'une radiothérapie grâce à un effet radiosensibilisant. La combinaison sur un même objet des fonctions de diagnostic et de thérapie a d'ailleurs donné lieu à un nouveau paradigme de la médecine moderne : la **théranostique**. De nombreux types de nanoparticules organiques ou inorganiques ont été développés dans ce sens (Figure 1-5) [36],[37]. Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéresserons uniquement au cas des nanoparticules inorganiques.

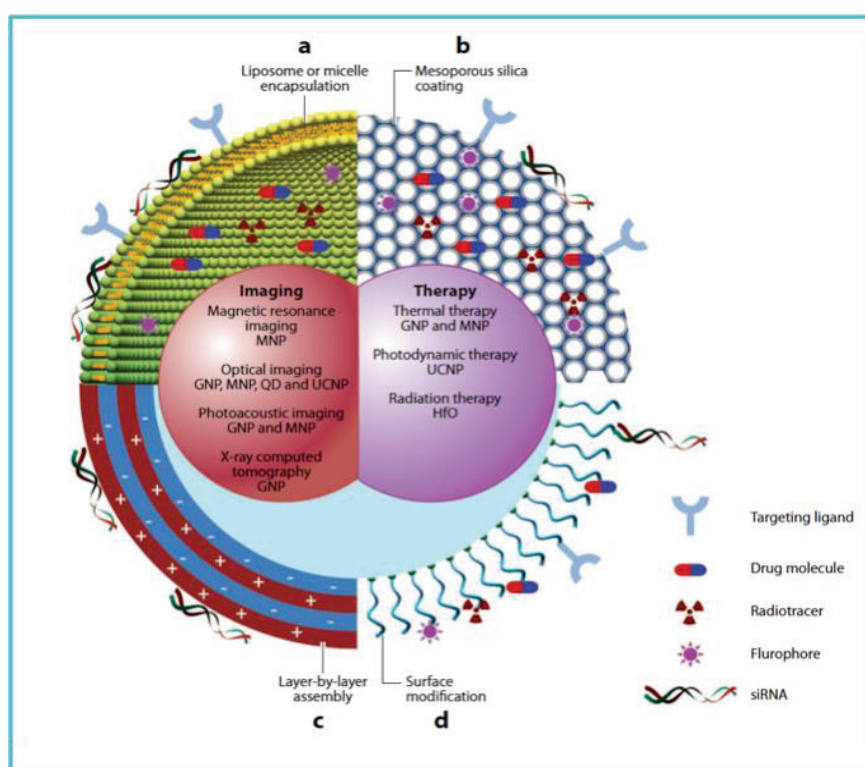


Figure 1-5: Diagramme schématique de nanoparticules multifonctionnelles. Les nanoparticules multifonctionnelles peuvent être générées soit en combinant des nanoparticules avec différentes fonctionnalités, soit en combinant les nanoparticules avec des molécules fonctionnelles *via* des stratégies de modification de surface, avec, notamment (a) des liposomes ou des encapsulations dans des micelles, (b) formation d'une coquille de silice, (c) assemblage « couche par couche », et (d) le greffage de ligands de surface. (Adapté de Bao *et al.* [36]).

1.2.1. LES NANOPARTICULES MAGNETIQUES

Les nanoparticules magnétiques sont principalement composées d'oxydes de fer. À l'échelle nanométrique, leur taille diminue jusqu'à atteindre celle d'un de leur domaines magnétiques. Selon leur taille, ces nanoparticules se regroupent en plusieurs catégories. On parle alors des « *superparamagnetic iron oxide* » (SPION – 100^{ne} de nm) et des « *ultra-small paramagnétiques iron oxide* » (USPIO <50 nm) (Figure 1-6) [38], [39].

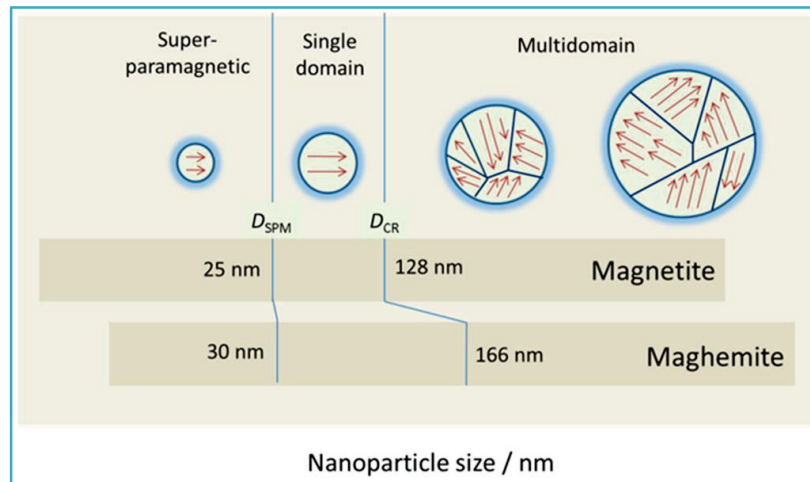


Figure 1-6 : Effet de taille sur les propriétés magnétique des nanoparticules d'oxyde de fer. Adapté de Estelrich *et al.* [39.]

Les SPIONs et USPIOs agissent comme agents de contraste négatifs T_2 en **IRM**, notamment pour l'imagerie du foie [40] ou des ganglions lymphatiques [41], organes dans lesquels ces nanoparticules s'accumulent après avoir été phagocytées par les macrophages. Dès les années 1990, les premières nanoparticules d'oxyde de fer ont été approuvées par la Food and Drug Administration pour ces applications en IRM, notamment le Feridex® et le Sinarem®. Seulement, depuis 2009, l'industrie pharmaceutique a cessé la production de ces Nps à cause de ventes trop faibles et de performances insuffisantes par rapport aux autres agents de contraste. Toutefois, les recherches sur ces nanoparticules continuent, et des améliorations sont apportées par l'ajout de vecteurs ciblands, de coating spécifiques ou d'intégrations dans des systèmes plus complexes tels que les liposomes. De plus, ces nanoparticules peuvent générer de la chaleur sous l'effet un champ magnétique (de 100 kHz à 1 MHz) et ainsi provoquer un phénomène d'**hyperthermie** [42] détruisant les cellules environnantes. La combinaison de l'imagerie IRM d'une tumeur couplée à une destruction locale des cellules malignes représente ainsi une application théranostique très intéressante pour ces nanoparticules.

1.2.2. LES NANOPARTICULES D'OR

Les applications biomédicales des nanoparticules d'or (AuNP) sont également très prometteuses. Ce métal noble biocompatible possède une chimie de surface connue et ne s'oxyde pas en présence d'air.

Les AuNP présentent une forte absorption dans le spectre visible, ce qui leur confère cette couleur rouge caractéristique. Cet effet est dû à un phénomène de résonance plasmonique de surface localisé (LSPR) où les électrons de valence des Nps oscillent de manière cohérente avec une lumière incidente à une fréquence spécifique (voir §3.2.1.2). Une partie de la lumière absorbée participe alors à l'effet plasmonique [43] tandis que le reste de l'énergie, dissipée sous forme de chaleur, permet, comme pour les nanoparticules d'oxyde fer, des applications en **hyperthermie** [44]. De plus, grâce au nombre atomique élevé de l'or ($Z = 79$), ces nanoparticules absorbent fortement les rayons X et sont donc d'excellentes candidates comme nouveaux agents de contraste en **tomodensitométrie RX** [45] afin de remplacer les composés iodés « traditionnels ». De par ces propriétés d'absorption des RX, les AuNP présentent également un effet radiosensibilisant. Lorsque ces nanoparticules sont accumulées dans les tumeurs, il est possible de les irradier avec un rayonnement de faible énergie, sans dommage pour les zones saines, et de générer une augmentation locale de la dose d'irradiation grâce à la formation d'électron Auger. Ces nanoparticules sont ainsi capables d'améliorer l'efficacité d'un traitement de **radiothérapie** [44],[46].

1.2.3. LES QUANTUMS DOTS

Les quantum dots (QDs) sont une bonne alternative vis-à-vis des fluorophores organiques pour des applications en **imagerie optique** [47],[48]. Ces nanocristaux de semi-conducteur (ex : CdSe, CdTe, HgTe, InAs, InP ou GaAs [49]) présentent un large spectre d'absorption pour une émission intense à des longueurs d'ondes spécifiques, pouvant être modulées en fonction des éléments utilisées, de la taille ou encore de la forme ou du revêtement des nanoparticules (Figure 1-7). En comparaison avec les fluorophores organiques, les QDs présentent de grands rendements quantiques, des coefficients d'extinction molaire important et sont particulièrement photostables [50]. La principale limitation quant à l'utilisation des QDs *in vivo* vient des problèmes de biocompatibilité et de toxicité induits par leurs compositions en métaux lourds [51].

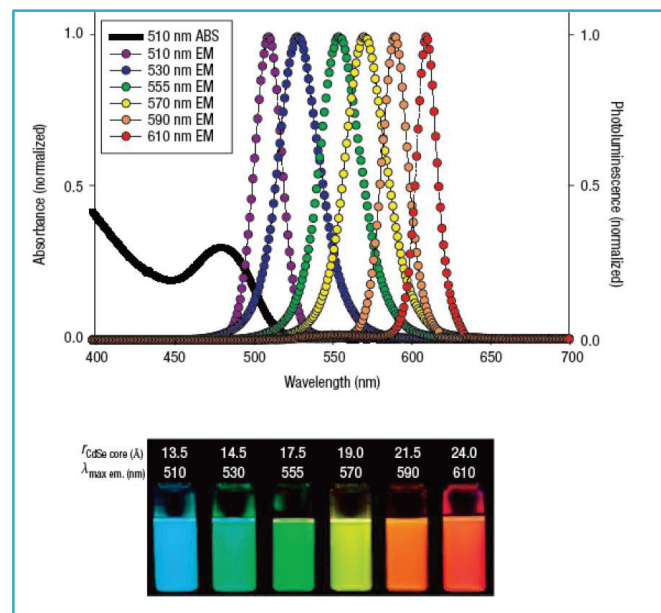


Figure 1-7 : Quantum dots absorbant et émettant dans la gamme de longueur d'onde du visible et leurs spectres d'absorption correspondants. Adapté de Medintz *et al.* [48].

1.2.4. LES NANOPARTICULES DE SILICE

De nombreux autres types de nanoparticules inorganiques ont été développés au cours des dernières années pour des applications en imagerie médicale et/ou en thérapie.

Les nanoparticules de silice mésoporeuses (MSNPs) présentent une bonne biocompatibilité, sont hydrophiles, leur morphologie peut aisément être modulée, et sont facilement fonctionnalisables par des biovecteurs [52].

Elles constituent un des systèmes inorganiques de délivrance de médicaments les plus prometteurs. En effet, les pores de ces MSNPs, qui présentent une surface spécifique très importante, peuvent être chargés par des principes actifs pour la **délivrance de médicament**, et/ou fonctionnalisés par des agents de contraste ou des biovecteurs [53]. Baeza et al. décrivent ainsi dans leur revue de nombreuses exemples de délivrance de médicaments par les MSNPs [54], notamment le relargage contrôlé des drogues *via* l'application d'un stimuli interne ou externe. Ces nanoparticules peuvent ainsi permettre d'améliorer considérablement un traitement de chimiothérapie en concentrant l'action des molécules cytotoxiques au niveau des cellules malades.

1.3. LA BIODISTRIBUTION DES NANOPARTICULES

Les différentes nanoparticules décrites ci-dessus ont toutes vocation à être injectées chez le patient. pour la réalisation de diagnostics plus précoces et plus précis. Idéalement, ces nouveaux outils permettraient de déceler l'apparition d'une pathologie avant l'apparition des premiers symptômes. La biodistribution de ces produits doit être idéale afin de cibler spécifiquement les zones ou pathologies à étudier et de garantir leur innocuité. Plusieurs paramètres peuvent entrer en jeu pour déterminer le comportement *in vivo* des nanoparticules.

1.3.1. INFLUENCE DES PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DES NPS

Le recours aux nanoparticules est très prometteur pour développer de nouvelles plateformes combinant imagerie et thérapie, seulement l'effet et le comportement des nanoparticules *in vivo* est encore méconnu et complique leur développement en phase clinique (composition en métaux lourds, rétention prolongée dans les tissus, ...). Pour répondre à ces enjeux, le Nanotechnology Characterization Laboratory (NCL) travaille avec la Food and Drug Administration (FDA) afin de mettre en place une stratégie générale pour le développement en phase clinique des nanoparticules : étude de leur toxicité et de leur efficacité ainsi que la construction d'un cahier des charges listant les caractérisations obligatoires [55].

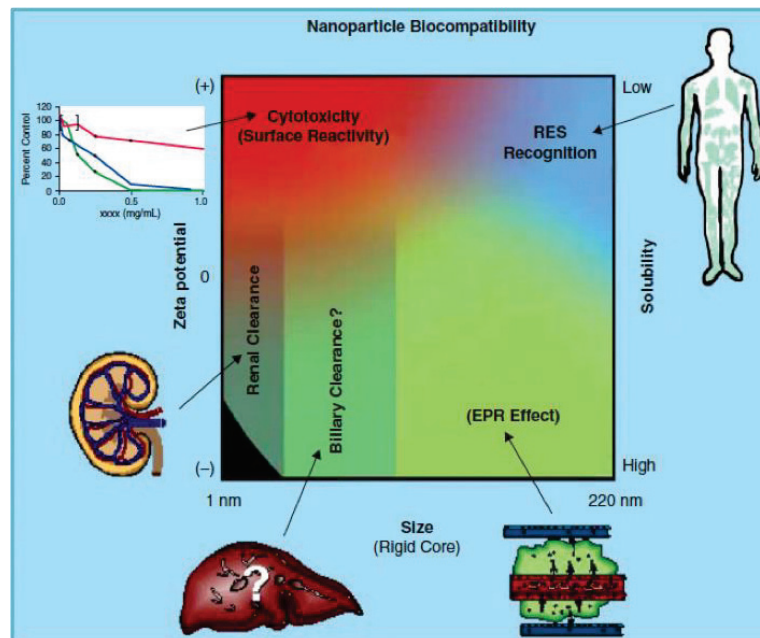


Figure 1-8 : Les caractéristiques physicochimique d'une nanoparticule influencent leur biocompatibilité. Ce schéma décrit qualitativement les tendances des relations entre les variables indépendantes tel que la taille de la Np, sa charge de surface (Potentiel Zeta), et sa solubilité avec la biocompatibilité – qui inclut la route d'assimilation et d'élimination (en vert), la cytotoxicité (en rouge), et la reconnaissance par le système réticuloendothélial (en bleu). (McNeil, 2009 ; [55])

La biocompatibilité des nanoparticules est ainsi évaluée selon leurs propriétés physicochimiques : leur taille (diamètre hydrodynamique), leur charge de surface (potentiel zêta) et leur solubilité ; et selon leur cytotoxicité (Figure 1-8).

La biodistribution des nanoparticules varie selon ces nombreux critères. Par exemple, les nanoparticules de 10-20 nm, notamment les SPIONs, sont connues pour s'accumuler préférentiellement dans le foie tandis que les nanoparticules d'un diamètre hydrodynamique inférieur à 6 nm seront plutôt éliminées par voie rénale [56]. Les nanoparticules excédant ces tailles seront elles éliminées *via* le système réticulo-endothélial (RES). La voie rénale est la plus favorable car elle permet une élimination plus rapide des Nps et évite la métabolisation de métaux ou de terres rares par l'organisme. La biodistribution des Nps peut également être influencée par certaines fonctionnalisations de surface. Le greffage de chaînes de PEG à haut poids moléculaire permet par exemple de limiter la captation des Nps par les macrophages et d'augmenter le temps de circulation dans le sang [57]. Enfin le greffage de certains ligands spécifiques permet « l'accroche » des Nps dans certaines zones d'intérêts [58].

1.3.2. CIBLAGE PASSIF

Dans le cas du diagnostic et/ou du traitement du cancer, les nanoparticules présentent un immense avantage : elles s'accumulent « spontanément » dans certaines tumeurs (Figure 1-9). En effet, lors de la croissance d'une tumeur maligne, de nombreux vaisseaux sanguins vont être créés pour l' « alimenter » : c'est le processus d'angiogenèse. Or, ces vaisseaux sont beaucoup plus perméables que des veines ou capillaires classiques. Les nanoparticules s'échappent via les interstices entre les cellules endothéliales et s'accumulent dans la tumeur, où le drainage lymphatique est plutôt faible comparé à des tissus sains [59].

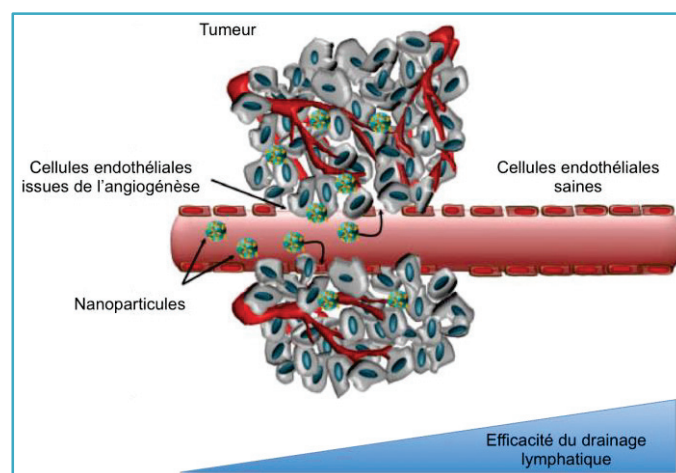


Figure 1-9 : Représentation schématique de l'effet EPR : l'espacement entre les cellules endothéliales issues de l'angiogenèse favorise le passage de nanoparticules vers la tumeur. Le faible drainage lymphatique conduit à une accumulation des Nps dans la zone maligne. Adapté de Kozlova *et al.* 2012 [59].

Ce phénomène, appelé effet EPR (Enhanced Permeation and Retention effect) dépend du flux sanguin au voisinage de la tumeur, de la perméabilité des vaisseaux et de la pression intratumorale [60].

1.3.3. CIBLAGE ACTIF PAR L'AJOUT DE VECTEURS

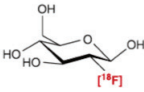
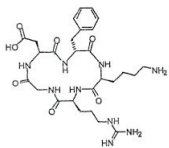



Afin d'améliorer l'accumulation des nanoparticules dans les tumeurs ou pour diagnostiquer des pathologies qui ne provoquent pas d'accumulation passive, les nanoparticules peuvent être vectorisées afin d'obtenir un ciblage actif de la zone/pathologie d'intérêt. Le mécanisme de ciblage fait appel aux interactions spécifiques entre le vecteur et la cible souhaitée.

Idéalement, un vecteur doit réunir plusieurs propriétés. Tout d'abord, il doit présenter une grande affinité et spécificité pour la zone d'intérêt et une interaction négligeable avec le reste de l'organisme. Ensuite, sa pharmacocinétique doit consister en une accroche avec la cible ainsi qu'une clairance sanguine rapides, une élimination par voie rénale, et une accumulation significative et persistante dans la zone d'intérêt. De plus, il est important que le vecteur soit stable *in vivo* et reste bien accroché à l'agent d'imagerie. Enfin, il faut prendre en compte la toxicité éventuelle du vecteur et/ou de l'agent de contraste ainsi que le coût et le temps nécessaire à leur synthèse.

Plusieurs familles de ligands ciblant ainsi ont été développées [58] notamment: i) des molécules organiques ; ii) des peptides ; iii) des oligonucléotides (aptamères) ; iv) des anticorps et fragments d'anticorps (Tableau 1-3).

Tableau 1-3 : Différentes familles de biovecteurs : avec leurs tailles approximatives, un exemple pour chaque classe, et les avantages et limitations de chacun. (Adapté de James et Gambhir, 2012 [58] et

http://sitemaker.umich.edu/betrnet/imaging_agents)

Ligand Ciblant	Molécules	Peptides	Aptamères	Nanobody	Anticorps
Taille	<1nm <0,5 Da	<1 nm – 4 nm <0,5Da – 2kDa	5-15 kDa	≈15 kDa	≈150 kDa
Exemple	 [¹⁸ F]-FGD	 cRGDFK	 BEACON	 B10Ap	 ICG-Trastuzumab
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> • Passage des barrières biologiques 	<ul style="list-style-type: none"> • Petite taille • Diversité • Faible Immunogénécité • Faible coût 	<ul style="list-style-type: none"> • Petite taille • Diversité • Faible immunogénécité • Grande affinité 	<ul style="list-style-type: none"> • Solubilité • Faible toxicité • Spécificité • Affinité 	<ul style="list-style-type: none"> • Spécificité • Diversité • Affinité
Limitations	<ul style="list-style-type: none"> • Non-spécificité • Production 	<ul style="list-style-type: none"> • Faible affinité • Dégradation <i>in vivo</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Coût • Production 	<ul style="list-style-type: none"> • Coût • Production 	<ul style="list-style-type: none"> • Immunogénécité • Coût • Production

Les molécules organiques (<500 Da) présentent souvent la propriété de traverser les barrières biologiques. Typiquement, selon leur charge et leur lipophilicité, elles peuvent aisément s'échapper du système vasculaire, se lier à leur cible et être éliminées rapidement de l'organisme. Cependant, les étapes nécessaires à leur découverte, leur synthèse et leur évaluation sont généralement longues, coûteuses et très peu de composés arrivent jusqu'au stade de la mise sur le marché [61].

Les peptides, quant à eux, ont émergé comme une classe importante de biovecteurs [62]. En effet, l'automatisation de leur synthèse en phase solide et le développement de banque de « phage display » ont permis l'essor de ces chaînes d'acides aminés comme ligands ciblant. Les peptides présentent certains avantages par rapport aux molécules organiques, notamment une plus forte affinité et sélectivité pour les cibles. Comparé aux anticorps, ils sont moins susceptibles d'induire des réactions immunogènes, sont moins chers; et de taille beaucoup plus réduite. Leurs principales limitations viennent du fait que leur temps de demi-vie est très court et qu'ils peuvent être dégradés *in vivo* par protéolyse. Toutefois, cette dégradation peut être limitée par l'utilisation de D-acides aminés ou en cyclisant le peptide. Par exemple, le cRGDfK (Tableau 1-3), présente une grande affinité pour les intégrines $\alpha_v\beta_3$, surexprimées chez les cellules endothéliales des néo-vaisseaux alimentant une tumeur [63].

Les aptamères (5-15 kDa) se composent quant à eux de brins d'oligonucléotides (d'ADN ou d'ARN) et se fixent à leurs cibles avec un très haut degré de spécificité et de sélectivité, ils sont également moins chers, plus faciles à synthétiser et moins immunogènes que les anticorps [64]. Le Pegaptanib, utilisé dans le traitement de la dégénérescence maculaire, est, en 2004, le premier aptamère approuvé par la FDA [65]. Depuis, de nombreux aptamères ont été développés. Les défauts des aptamères sont leur faible stabilité *in vivo* et leur temps de demi-vie court. De plus, ils ne traversent pas les barrières biologiques aussi bien que les molécules ou les peptides.

Enfin, les anticorps sont utilisés pour cibler des antigènes connus avec un exceptionnel degré d'affinité. D'une masse moyenne d'environ 150 kDa, les anticorps circulent longtemps dans l'organisme avant d'être éliminés. Cependant, ils peuvent être fortement immunogènes, surtout lorsqu'ils ont été produits à partir d'animaux (ex : souris, lapin, ...). Au cours des dernières années, des fragments d'anticorps « modifiés » ont été développés. On retrouve par exemple les Diabodies, dimères de fragment d'anticorps à chaîne unique ou les Affibodies (protéines d'environ 7 kDa), qui miment les effets des anticorps. Plus surprenant, l'équipe de Hamers a découvert à la fin des années 1980 que les anticorps de camélidés ne possédaient pas de chaînes légères [66]. L'isolation de la

zone variable permet d'obtenir un Nanobody, un fragment d'anticorps de 15 kDa, très stable et très hydrophile [66].

Les différents vecteurs utilisés au cours de la thèse seront décrits ultérieurement dans les parties correspondantes.

1.3.4. VERS UNE NANOPARTICULE IDEALE

Nous venons de voir que les nanoparticules représentent un immense potentiel dans le développement de nouveaux diagnostics et traitements. Les propriétés intrinsèques des objets permettent d'allier plusieurs techniques d'imagerie et de thérapie sur une seule et même plateforme. En contrôlant au mieux leur biodistribution, il devient possible d'effectuer des diagnostics à des stades très précoces des maladies et de les traiter en augmentant significativement le ratio bénéfice/risque [35], [67]. Cependant, les effets à long terme des nanoparticules sur la santé et l'environnement sont encore méconnus. Les chimistes, biologistes, médecins, physiciens et ingénieurs doivent travailler en synergie afin de développer ces plateformes jusqu'au stade clinique.

1.4. LE CAS DE LA NANOPARTICULE AGuIX

Notre équipe a développé de nouvelles nanoparticules pour l'imagerie multimodale et la thérapie [2], [68], [69] issues d'un procédé de synthèse top-down (voie descendante) original : les nanoparticules AGuIX.

1.4.1. UN PROCEDE TOP-DOWN ORIGINAL

La synthèse de ces nanoparticules se déroule en plusieurs étapes (Figure 1-10)^A. Les premières étapes s'effectuent dans le diéthylène glycol (DEG) : tout d'abord, des cœurs d'oxyde de gadolinium Gd_2O_3 sont synthétisés par la voie polyol. Les cœurs d'oxyde sont ensuite enrobés par procédé sol-gel par une couche de polysiloxane composée de tétraéthoxysilane (TEOS) et de 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES). Enfin, le DOTAGA est greffé sur les nanoparticules par réaction entre son anhydride et une amine primaire issue du précurseur APTES.

Si ces particules sont stables dans le DEG, une dissolution du cœur oxyde se produit lors de leur passage dans l'eau : ce phénomène est favorisé par la présence des ligands DOTA qui vont chélater les ions Gd^{3+} . La structure de polysiloxane s'effondre sur elle-même et se fragmente alors pour donner lieu aux nanoparticules AGuIX. Composées d'un squelette de polysiloxane entouré par environ 10 DOTAGA(Gd^{3+}), ces nanoparticules ont un diamètre hydrodynamique moyen de $2,5 \pm 0,5$ nm et une masse d'environ $8,5 \pm 1$ kDa.

^A Annexe 1 : Protocole de synthèse des Nps AGuIX

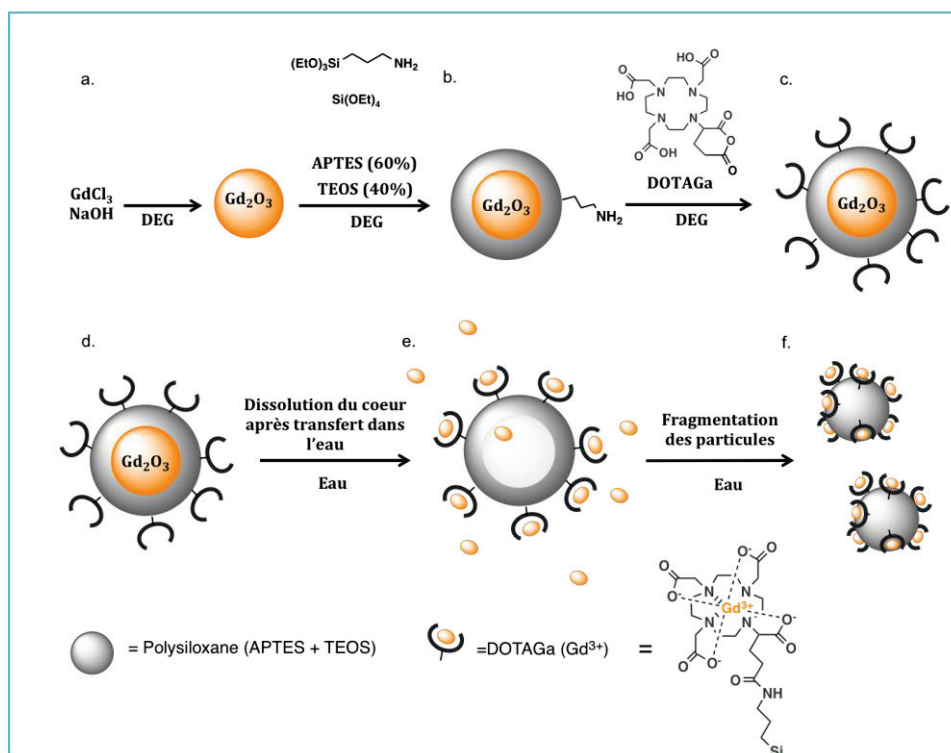


Figure 1-10 : Synthèse des nanoparticules AGuIX : *a.* Synthèse du cœur d'oxyde de gadolinium ; *b.* Enrobage du cœur par une couche de polysiloxane ; *c.* Greffage des ligands DOTAGA ; *d.* Transfert du diéthylène glycol à l'eau ; *e.* Dissolution du cœur d'oxyde ; *f.* Fragmentation des particules.

1.4.2. BIOCOMPATIBILITE & BIODISTRIBUTION

Le squelette des nanoparticules AGuIX est composé de polysiloxane (APTES et TEOS) et ne pose pas de problème de biocompatibilité. De par sa stabilité thermodynamique, le recours aux ligands DOTA pour la complexation du gadolinium issu du cœur oxyde des nanoparticules AGuIX est un choix garantissant que les risques de relargage de Gd^{3+} dans l'organisme seront minimisés lors d'une future injection de ces Nps chez le patient (voir §1.1.1.2).

Comme attendu de par leur petit diamètre hydrodynamique ($\approx 2,5 \pm 0,5$ nm), les études menées quant à la biodistribution et la pharmacocinétique des nanoparticules AGuIX *in vivo* chez la souris montrent leur captation rénale rapide suivie d'une élimination *via* les urines [2], [70], (Figure 1-12).

Les dernières études sur l'élimination à long terme des AGuIX [71] ont été réalisées par des techniques complémentaires (microscopie intra-vitale à deux photons, spectrométrie de masse avec ionisation à torche plasma, spectrométrie sur plasma induite par laser et microscopie électronique). Elles montrent un mécanisme d'élimination en deux étapes incluant l'élimination rapide des plus petites nanoparticules ainsi que de leurs produits de dégradation, suivie par une élimination plus longue des nanoparticules de taille plus importante.

Aucune des nombreuses études menées *in vivo* n'a montré de toxicité particulière des nanoparticules AGuIX. Ces Nps sont actuellement en développement GMP (Good Manufacturing Practice) en vue de tests précliniques et cliniques. La première injection des nanoparticules AGuIX chez l'humain est prévue pour début 2016.

1.4.3. UNE PLATEFORME D'IMAGERIE MULTIMODALE

De par leurs propriétés intrinsèques, ou *via* l'ajout de nouvelles fonctionnalités, les nanoparticules AGuIX peuvent combiner jusqu'à trois techniques d'imagerie médicales (IRM, scintigraphie et imagerie de fluorescence), alliant ainsi sensibilité et résolution.

1.4.3.1. UN EXCELLENT AGENT DE CONTRASTE IRM

Comme explicité précédemment, l'IRM a émergé comme une des principales techniques d'imagerie médicale. En effet, elle permet d'obtenir une résolution spatiale inégalée par les autres techniques et ne fait pas appel à des rayonnements ionisants.

L'utilisation d'agents de contraste permet de diminuer considérablement le temps de relaxation des protons des tissus étudiés et ainsi d'améliorer le diagnostic en permettant une meilleure caractérisation des tissus [13]. Comme précisé ultérieurement (voir §1.1.1.2), l'efficacité d'un agent de contraste est définie par sa vitesse de relaxation r_i ($i=1$ ou 2), or celle-ci dépend notamment des paramètres suivants [13],[35],[72] (Figure 1-11) :

- nombre d'hydratation q , soit le nombre de molécules d'eau participant à la sphère de coordination du Gd^{3+} ;
- nombre d'hydratation q_{ss} , soit le nombre de molécules d'eau présentes dans le voisinage immédiat du complexe de Gd^{3+} ;
- la vitesse d'échange des molécules d'eau dans la sphère de coordination τ_M ;
- le temps de relaxation électronique T_{ie} des électrons de l'ion métallique ;
- le temps de corrélation rotationnel τ_R .

Afin d'augmenter la relaxivité des agents de contraste, une des stratégies les plus prometteuses consiste conjuguer plusieurs complexes de Gd^{3+} sur une même structure. En effet, dans le cas d'une structure macromoléculaire telle que celle des nanoparticules AGuIX, deux temps de corrélation rotationnels entrent en jeu : τ_{RL} qui dépend du degré de mouvement interne du complexe de DOTA(Gd^{3+}) accroché à la structure par un bras espaceur et τ_{RG} qui représente le temps de corrélation rotationnel global de la structure. Ces temps sont beaucoup plus longs que dans le cas d'un complexe moléculaire seul.

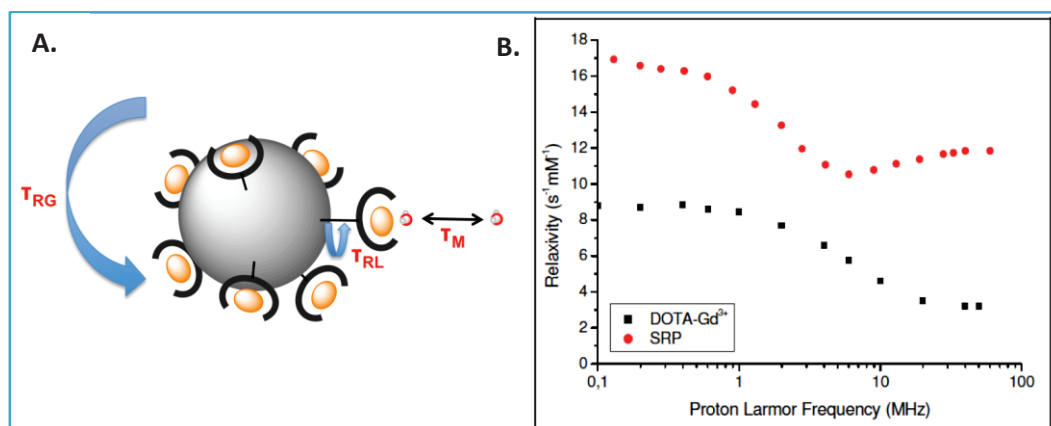


Figure 1-11 : a) La relaxivité d'un agent de contraste à base de complexe de Gd^{3+} dépend du temps de corrélation rotationnel global τ_{RG} , du degré de mouvement interne τ_{RL} et de la vitesse d'échange τ_M des molécules d'eau dans la sphère de coordination interne du Gd^{3+} . Adapté de Botta et al. 2012 [72]. b) Profils NMRD des nanoparticules AGuIX (anciennement dénommées SRP) et du DOTAREM® (ou DOTA(Gd^{3+})), Mignot et al. 2012 [68].

Les mesures de NMRD (Relaxation de Résonance Magnétique Nucléaire) montrent bien une augmentation significative de la relaxivité des AGuIX en comparaison avec les complexes de DOTA(Gd^{3+}) moléculaires. À 60 MHz à 37°C, les nanoparticules AGuIX, dont le squelette de polysiloxane est entouré de ligands DOTA(Gd^{3+}) présentent une vitesse de relaxation longitudinale r_1 de $10,2 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ et transversale r_2 de $13,8 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$. Ainsi, son ratio r_2/r_1 , égal à 1,32 démontre que ces Nps se comportent comme un agent de contraste IRM positif. Le r_1 de ces nanoparticules est bien supérieur à celui du DOTA(Gd^{3+}) seul ($r_1=3,4 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$).

Les nanoparticules AGuIX permettent ainsi d'obtenir un meilleur contraste en IRM par rapport aux agents de contraste moléculaires « classiques » (Dotarem®, Magnévist®, ...). Les images IRM réalisées après injection d'AGuIX chez la souris montrent bien l'obtention d'un contraste significatif comparées aux images d'une souris après injection de Dotarem® (Figure 1-12).

1.4.3.2. EGALEMENT UN AGENT D'IMAGERIE POUR LA TEMP, TDM ET IMAGERIE OPTIQUE

Des images obtenues par tomographie à émission de positon couplée à la tomodensitométrie (TEP/TDM) ont été réalisées. Pour cela, les nanoparticules ont été radiomarquées par complexation de l'indium-111 par les ligands DOTA. Le contraste obtenu par tomodensitométrie est permis par l'absorption des rayons X du gadolinium grâce à son haut numéro atomique ($Z=64$), mais nécessite l'injection de Nps à hautes concentrations.

Enfin, des souris injectées par des AGuIX marquées par la cyanine 5,5 (AGuIX@Cy5,5) permettent également de suivre les nanoparticules *in vivo* par imagerie optique (Figure 1-12). Dans ce cadre,

plusieurs fluorophores organiques furent greffés sur les nanoparticules AGuIX au cours de la thèse. Les propriétés de ces fluorophores respectifs, la synthèse et la caractérisation des AGuIX@Fluo et quelques exemples d'applications seront explicités dans la partie §2.4.

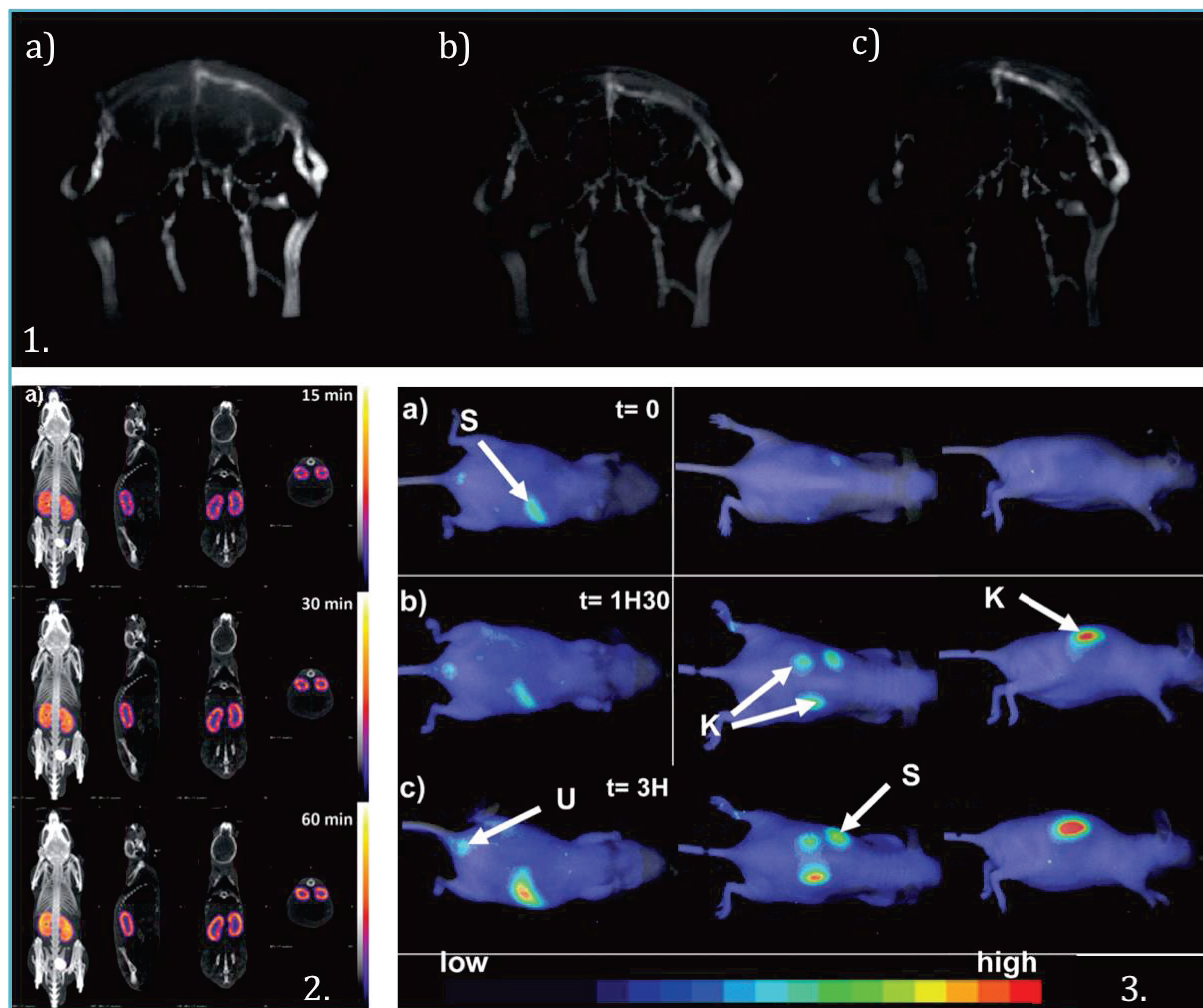


Figure 1-12 : Imagerie multimodale induite par la nanoparticule AGuIX : 1. Images IRM pondérées en T1 d'une souris C57bl6 mâle, avec, de gauche à droite : a) aucun agent de contraste ; b) des nanoparticules AGuIX à 40 mM en Gd^{3+} ; c) du DOTAREM® à 40 mM en Gd^{3+} . **2.** Images TEM/TDM in vivo d'une souris à plusieurs temps après injection des AGuIX. De gauche à droite : projection des intensités maximales, puis vues sagittales, coronales et transversales centrées sur le rein gauche. **3.** Imagerie Optique de fluorescence d'une souris femelle nue a) avant; b) 90 minutes, c) 3h après injection des AGuIX@Cy5,5 à 10 mM en Gd^{3+} . (K : rein, S : estomac, U : urine). Adapté de Lux et al. , 2011 [2].

1.4.3.3. ACCUMULATION DANS LES TUMEURS ET EFFET RADIO-SENSIBILISANT

Les nanoparticules AGuIX s'accumulent efficacement dans les tumeurs par effet EPR quel que soit le mode d'administration (aérosol ou injection). Chez des souris porteuses de gliosarcomes, il a été observé par IRM un contraste significatif dans la tumeur, en comparaison aux tissus sains 17 minutes

après l'injection de Nps. Après l'accumulation dans les tumeurs des nanoparticules, les souris ont été soumises à des rayonnements X de diverses énergies. Il a ainsi été prouvé que les AGuIX possédaient un fort pouvoir radiosensibilisant et permettaient d'augmenter significativement l'efficacité d'un traitement radiothérapeutique à des énergies plus faibles que celles actuellement utilisées en clinique [4] (Figure 1-13).

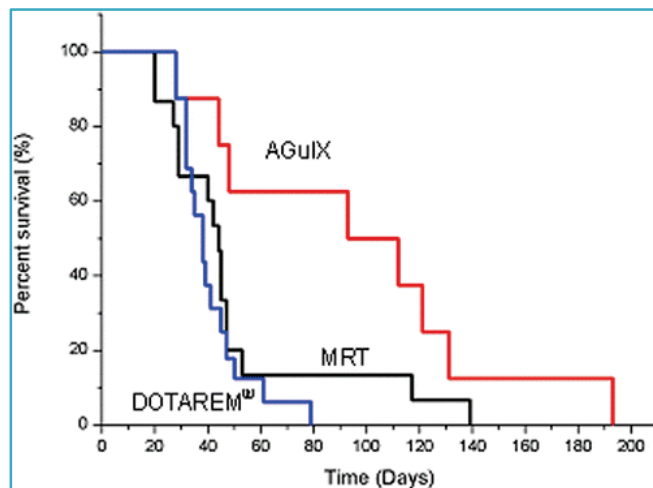


Figure 1-13 : Courbes de survie de rats porteur de tumeur traités (i) uniquement par radiothérapie à microfaisceau (MRT) (15 rats) ; (ii) par MRT 20 minutes après l'injection de DOTAREM® ; (iii) par MRT après injection de Nps AGuIX.

Adapté de Sancey *et al.* [4].

1.4.3.4. CONCLUSION

Les nanoparticules AGuIX, de par leur petite taille sont efficacement éliminées par voie rénale et ne présentent pas de toxicité avérée. Elles permettent de coupler trois techniques d'imagerie médicale différentes et ainsi de combiner un excellent contraste et une haute résolution des images. Après accumulation passive dans les tumeurs, ces nanoparticules radiosensibilisantes permettent d'augmenter significativement l'efficacité d'une radiothérapie. Ainsi, ces Nps ont un immense potentiel comme agent théranostique pour le diagnostic et le traitement des tumeurs par ciblage passif.

La vectorisation de ces nanoparticules par des ligands ciblant permettrait i) d'améliorer la rétention des nanoparticules dans les tumeurs, ii) de diagnostiquer et/ou traiter des zones ou pathologies non accessible *via* ciblage passif. Plus particulièrement, le greffage de vecteurs à leur surface permettrait également le ciblage de zone ou de pathologies non accessibles par effet EPR.

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés au ciblage actif de plaques amyloïdes ou de cellules hépatocytes du foie, grâce à la fonctionnalisation des AGuIX par différents vecteurs ciblant.

CHAPITRE 2 : MODIFICATION DE SURFACE DES NANOPARTICULES AGuIX

2. MODIFICATION DE SURFACE DES NANOPARTICULES AGuIX

2.1. INTRODUCTION

Les nanoparticules multifonctionnelles sont un outil émergeant et très prometteur dans le domaine de la médecine et de la biologie. Ces nano-objets peuvent intrinsèquement, de par leurs propriétés physico-chimiques, donner accès à plusieurs techniques d'imagerie et de thérapie. La nanoparticule AGuIX permet notamment d'augmenter le contraste obtenu lors d'une imagerie IRM et d'améliorer l'efficacité d'un traitement de radiothérapie grâce à son effet radiosensibilisant [4].

Il est possible d'ajouter de nouvelles fonctionnalités sur ces plateformes afin de bénéficier i) de plusieurs techniques d'imageries, ii) de modifier leur biodistribution, iii) de réduire leur toxicité, iv) d'améliorer leur stabilité, v) de cibler spécifiquement certaines pathologies, vi) ou encore d'inclure un agent thérapeutique. Ainsi, depuis 30 ans, de nombreux travaux ont été menés dans le domaine de la bioconjugaison [73] et de la chimie de surface appliquées aux nanoparticules [74]. La stratégie de fonctionnalisation des Nps dépend de nombreux facteurs tels que le type de nanoparticules (Quantum Dots, nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques ou nanoparticules d'or, ...) (voir §1.2), leur taille, leur chimie de surface, leur forme mais également le type de ligand à ajouter. Ainsi, aucun protocole « standard » de fonctionnalisation des Nps n'a été développé, et les stratégies de fonctionnalisation doivent être développées au « cas par cas ».

Dans le cadre de ce sujet de thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés à la fonctionnalisation des nanoparticules AGuIX dans le but de cibler spécifiquement les plaques amyloïdes ou encore les cellules hépatocytes du foie. Les différents ligands sélectionnés dans cet objectif sont i) des molécules organiques, ii) des peptides, iii) des nanobodies. De plus, les nanoparticules AGuIX ont également été fonctionnalisées par différents fluorophores, afin d'accéder à certaines techniques de caractérisation *in vitro* mais également pour pouvoir suivre les nanoparticules *in vivo* par imagerie optique.

Certains ligands ciblant utilisés au cours de la thèse, tels que les peptides, le lactose-o-éthylamine, les nanobodies et le Pittsburgh Compound B présentent une ou plusieurs amines primaires. Dans ce cas, la stratégie de greffage idéale consiste à réaliser un couplage peptique (formation d'une liaison amide) entre ces amines primaires et un acide carboxylique présent sur la nanoparticule. Certains vecteurs ciblant comportent quant à eux une fonction thiol ou maléimide et peuvent être greffés par couplage maléimide. Enfin, certains fluorophores commerciaux tels que la FITC ou la RBITC

comportent une fonction isothiocyanate qui réagit avec les amines primaires pour former une liaison covalente isothiourée.

Selon l'espèce à greffer sur les AGuIX, certaines fonctions chimiques devront préalablement être introduites à la surface des Nps. Ainsi, ce chapitre présente dans un premier temps les fonctions de surface accessibles sur les Nps. Nous nous pencherons ensuite sur les différentes stratégies réalisées au cours de la thèse quant à la modification de surface des Nps par l'ajout (i) de nouvelles fonctionnalités tels que les acides carboxyliques et les thiols, (ii) le marquage par un traceur fluorescent.

2.2. FONCTIONS CHIMIQUES DISPONIBLES SUR LES AGuIX

Les nanoparticules AGuIX sont composées d'un réseau de polysiloxane à la surface duquel sont greffés de manière covalente des ligands DOTAGA(Gd^{3+}). *A priori*, les seules fonctionnalités chimiques disponibles sont les amines primaires issues du réseau de polysiloxane. Pour quantifier ces fonctions, nous avons dans un premier temps calculé la formule brute des nanoparticules AGuIX à partir de résultats d'analyse élémentaire pour ensuite valider ce résultat par une méthode colorimétrique.

2.2.1. PROPOSITION D'UNE FORMULE BRUTE (ANALYSE ELEMENTAIRE)

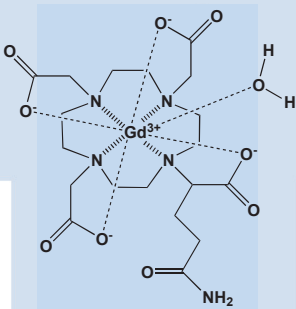
Le recours à l'analyse élémentaire permet d'obtenir les pourcentages massiques en gadolinium, silicium, carbone et azote avec une erreur absolue de 0,5%. Ces mesures ont été réalisées par l'Institut des Sciences Analytiques (ISA) de Villeurbanne, les pourcentages massiques obtenus sont convertis en rapport molaire par rapport à une mole de gadolinium (Tableau 2-1). Le raisonnement effectué afin de proposer une formule brute est le suivant :

Tableau 2-1 : Pourcentages massiques et rapports molaires des éléments Gd, C, N et Si des nanoparticules AGuIX

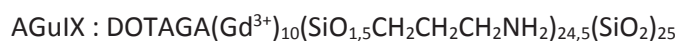
	Gd	Si	C	N
% massique	13,1	11,5	26,6	7,6
Rapport molaire (normalisé par rapport au nb de moles de Gd)	1	4,93	26,62	6,50

Les nanoparticules AGuIX sont composées d'un réseau de polysiloxane fonctionnalisé par des chélates de DOTAGA(Gd^{3+}). Ce réseau inorganique est obtenu à partir de la condensation des précurseurs alkoxysilanes APTES et TEOS qui forment alors les fragments ($SiO_{1,5}CH_2CH_2CH_2NH_2$) et (SiO_2) respectivement. Le DOTAGA, qui est greffé sur l'amine primaire du composé APTES, perd les 3 protons présents sur les acides carboxyliques après complexation du Gd^{3+} . Les nombres d'atomes respectifs de gadolinium, silice, carbone et azote de chacun de ces constituants de la nanoparticule sont connus et sont reportés dans le Tableau 2-2.

Tableau 2-2 : Composition en chaque élément analysé des constituants des AGuIX, ainsi que leur masse molaire correspondante (g.mol⁻¹).

Constituant	Gd	Si	C	N	Fragment	Masse molaire du fragment
(SiO ₂)	0	1	0	0	SiO ₂	60
(SiO _{1,5} aminopropyl)	0	1	3	1	SiO _{1,5} CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₂	110
DOTAGA	0	0	19	4		458,5
Gd ³⁺	1	0	0	0		157,25
Nb de moles	1	4,93	26,62	6,50		

Il faut donc résoudre ce système d'équations à plusieurs inconnues afin de proposer une formule brute. Expérimentalement, il apparaît que le nombre de ligands DOTAGA libres (ne chélatant pas un ion Gd³⁺) est négligeable. L'hypothèse que le nombre de moles de (SiO_{1,5}aminopropyl)-DOTAGA-APTES est égal au nombre de moles de Gd³⁺ est donc effectuée et permet de soustraire le nombre de moles de carbone, azote et silice respectivement. Les études de spectrométrie de masse réalisées lors des thèses d'Anna Mignot et de Charles Truillet ont révélé que les nanoparticules AGuIX présentaient en moyenne 10 ligands DOTAGA par nanoparticules [69], [75]. En partant de cette hypothèse, nous pouvons déterminer le nombre de moles d'APTES et de TEOS, et ainsi obtenir la formule suivante :



Cette formule brute théorique est ensuite vérifiée en recalculant les pourcentages massiques obtenus à partir de celle-ci. Lors de cette étape il convient de prendre en compte les éléments autres que le Gd, Si, N et C dans le calcul de la masse totale, notamment l'hydrogène et l'oxygène des molécules d'eau, qui représentent une masse non identifiée. Les pourcentages massiques ainsi obtenus correspondent bien aux résultats expérimentaux (Tableau 2-3).

Tableau 2-3 : Comparaison des pourcentages massiques i) obtenus expérimentalement, ii) calculés à partir de la formule brute proposée.

	%Gd	%Si	%C	%N
%massique exp	13,1	11,5	26,6	7,6
%massique théo	13,1	11,5	26,6	7,6

La même stratégie a été suivie pour déterminer les formules brutes des nanoparticules fonctionnalisées.

2.2.2. DOSAGE DES AMINES PRIMAIRES

Le nombre total d'amines primaires issues des précurseurs APTES est également quantifié par une méthode colorimétrique. Le 2,4,6-trinitrobenzenesulfonate (TNBS) réagit avec les amines primaires pour former un dérivé coloré orange, avec deux maxima d'absorption à 335 et 420 nm (Figure 2-1). Ce composé a été développé dans les années 60 par Habeeb et Kakade, comme test quantitatif pour les amines, les thiols, ou les hydrazines [76], [77]. En 1994, Sashidhar *et al.* décrivent l'utilisation de cette molécule comme test sélectif de la quantification des ϵ -amines issues des lysines des protéines [78]. Ce test est donc particulièrement adapté au dosage des amines primaires des nanoparticules AGuIX.

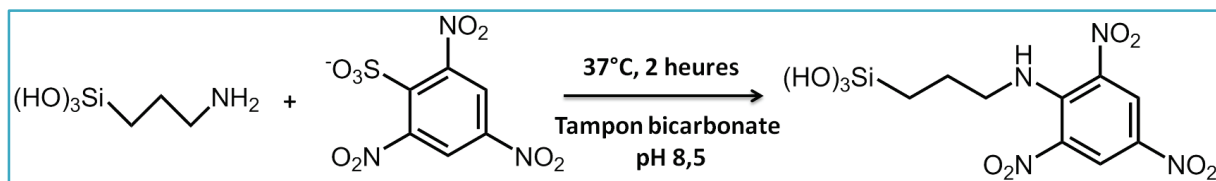


Figure 2-1 : Réaction entre le TNBS et les amines primaires issues du précurseur APTES.

PROTOCOLE

La suspension de nanoparticules à doser est diluée dans un tampon bicarbonate 0,1 M à pH 8,5 à des concentrations allant de 10 à 500 μ M en Gd^{3+} . A ce pH et dans cette gamme de concentration, le réseau de polysiloxane des AGuIX est hydrolysé et les nanoparticules se fragmentent. La destruction du squelette de polysiloxane permet ainsi de quantifier les amines qui auraient été présentes au centre du réseau et, par conséquent, auraient été inaccessibles pour une réaction avec le composé TNBS. Un volume de 500 μ L de solution de TNBS à 2,5 mM dans le tampon bicarbonate à 0,1 M est ajouté à 1 mL de suspension de nanoparticules diluées. Les échantillons sont incubés à 37°C pendant

2 heures, puis la réaction est stoppée par ajout de 500 μL de sodium dodecylsulfate (SDS) à 10% (volumique) et 250 μL d'une solution d'acide chlorhydrique concentré à 1 M.

RESULTATS

D'après les résultats d'analyse élémentaire, les nanoparticules AGuIX présentent la formule brute suivante :



Afin de valider, cette méthode d'analyse, une gamme étalon a donc été réalisée à partir d'une solution équimolaire d'APTES et de TEOS. Ce mélange des deux précurseurs permet de réaliser l'étalonnage dans des conditions comparables à celles du dosage des Nps (Figure 2-2).

Les pentes obtenues pour la solution équimolaire d'APTES/TEOS et pour la suspension de nanoparticules AGuIX sont très proches ce qui permet de valider à la fois cette méthode de quantification et la formule proposée à partir des résultats d'analyse élémentaire. En effet, étant donné que le DOTAGA est greffé aux nanoparticules par couplage amine sur les APTES, le nombre d'amines primaires est égal au nombre total d'APTES moins le nombre de DOTAGA.

$$\text{nb}(\text{NH}_2) = \text{nb}(\text{SiO}_{1,5}\text{aminopropyl}) - \text{nb}(\text{DOTAGA}(\text{Gd}^{3+}))$$

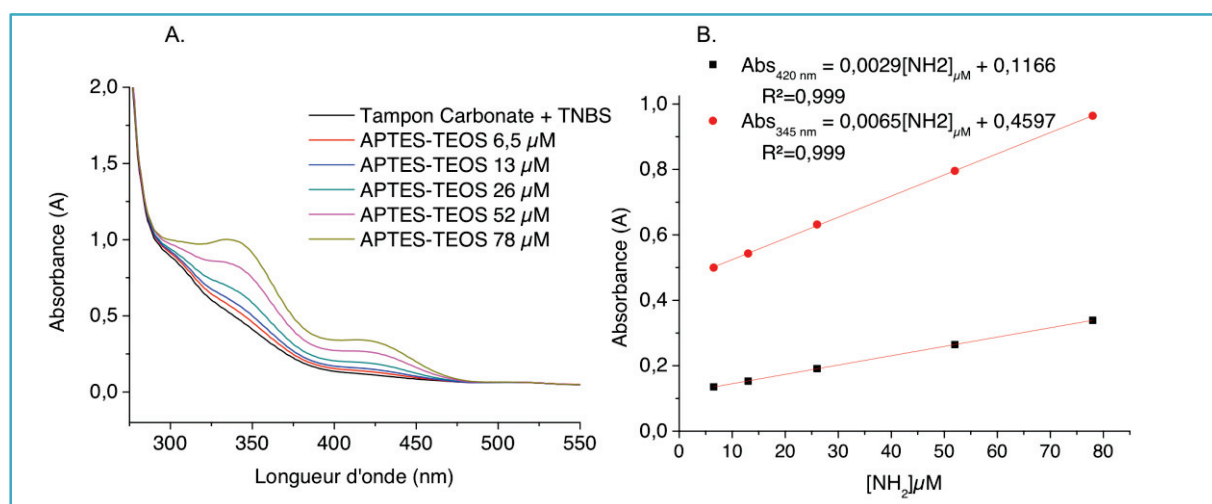


Figure 2-2 : A. Spectres d'absorption des étalons APTES-TEOS en présence de TNBS. B. Droite étalon de l'absorption du TNBS en fonction de la concentration relative en APTES-TEOS, à 345 nm et 420 nm respectivement.

Ce calcul conduit à 1,45 $\text{NH}_2/\text{Gd}^{3+}$, très proche du ratio de $1,55 \pm 0,20 \text{ NH}_2/\text{Gd}^{3+}$ obtenu par dosage TNBS. Les nanoparticules fonctionnalisées (par des ligands de surface ou des biovecteurs) ont ainsi été analysées selon le même protocole et à partir de cet étalonnage.

2.2.3. NECESSITE D'AJOUT DE NOUVELLES FONCTIONNALITES

La principale réaction de couplage réalisée sur les amines primaire consiste en leur condensation avec un acide carboxylique pour former une liaison amide. Or, au cours de la thèse, plusieurs biomolécules à coupler aux nanoparticules comportent des fonctions amines primaires, thiols ou maléimides. Afin de les greffer à la surface des AGuIX par une liaison covalente, il peut donc être nécessaire d'introduire à la surface des Nps de nouvelles fonctionnalités chimiques telles que des acides carboxyliques ou des thiols (Figure 2-3).

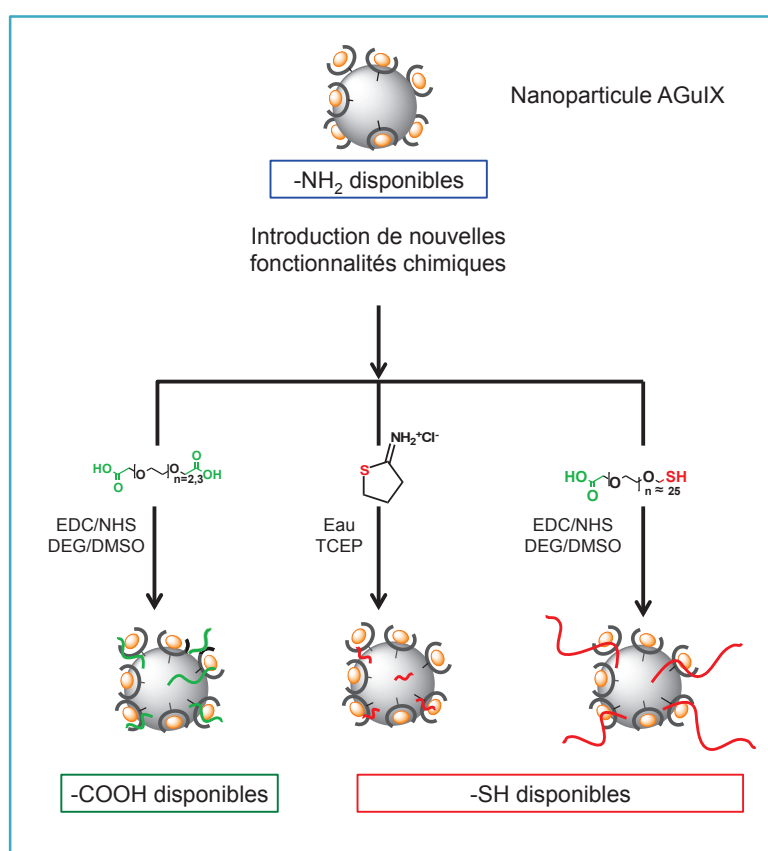


Figure 2-3 : Stratégies de modification de surface des nanoparticules pour l'introduction de nouvelles fonctionnalités chimiques en vue d'une vectorisation pour un ciblage actif.

Des fonctions acides carboxyliques ont ainsi été introduites *via* des bras espaceurs homobifonctionnels PEG présentant un acide carboxylique à chaque extrémité. Dans le cas de l'ajout de fonctions thiols, deux stratégies ont été mises en place : (i) *via* l'utilisation du réactif de Traut's, molécule cyclique réagissant avec les fonctions amines primaires ; (ii) *via* le greffage d'un bras espaceur hétérobifonctionnel présentant une terminaison acide carboxylique et une terminaison thiol.

Pour chacune de ces stratégies, les particules seront dans un premier temps caractérisées par un ensemble de techniques qualitatives. Concrètement, la fonctionnalisation des nanoparticules AGuIX entraîne :

(i) une augmentation de leur diamètre hydrodynamique : mesuré par granulométrie (DLS) à l'aide d'un granulomètre Malvern® NanoZS ($\lambda = 633$ nm) ou NanoS ($\lambda = 532$ nm). Des interférences pouvant intervenir dans le cas où les produits à tester absorbent à la longueur d'onde du laser, le choix de l'appareillage dépendra de la particule étudiée. Ainsi, pour des mesures de taille de Nps marquées par exemple à la cyanine 5,5 ($\lambda_{\text{abs}} = 675$ nm), l'utilisation du NanoS sera préconisée.

(ii) une augmentation de leur relaxivité longitudinale r_1 (voir §1.4.3.1), mesurée à l'aide d'un relaxomètre Bruker® mq60NMR à 60 MHz et 37°C.

(iii) une modification de leur temps de rétention observé en Chromatographie Liquide à Haute performance (HPLC), sur une chromatographie Shimadzu®. Ces modifications sont induites par les modifications de taille et de surface des nanoparticules. La détection est réalisée par absorption UV-Visible au maximum d'absorption des nanoparticules ($\lambda = 295$ nm) et éventuellement à certaines longueurs d'ondes d'absorption UV-Visible et de fluorescence caractéristiques des produits greffés.

La quantification des fonctionnalités introduites sera quant à elle réalisée par un ensemble de techniques regroupant l'analyse élémentaire, des dosages colorimétriques ou encore de la spectroscopie en temps résolu. Ces dernières techniques seront explicitées au cas par cas.

La partie suivante présente ainsi les différentes réactions de couplages réalisées au cours de la thèse pour introduire les fonctions chimiques souhaitées.

2.3. AJOUT DE FONCTIONNALITES CHIMIQUES

2.3.1. AJOUT DE FONCTIONS ACIDES CARBOXYLIQUES

Des fonctions acides carboxyliques sont introduites à la surface des nanoparticules *via* couplage peptidique avec les amines issues du réseau de polysiloxane. La partie suivante explicite les différents éléments entrant en jeu lors de cette réaction.

2.3.1.1. LE COUPLAGE PEPTIDIQUE

2.3.1.1.1. GENERALITES

La formation de liaison amide est une des réactions de couplage les plus couramment utilisées dans le domaine de la bioconjugaison (Figure 2-4). Cette liaison est largement répandue dans les produits naturels où elle constitue notamment le « squelette » permettant de relier les acides aminés les uns aux autres au sein des protéines. Si les fonctions amides se rencontrent dans les produits naturels, le couplage entre un acide carboxylique et une amine ne se produit pas spontanément. Ces deux produits forment à la place un sel stable de carboxylate d'ammonium [79].

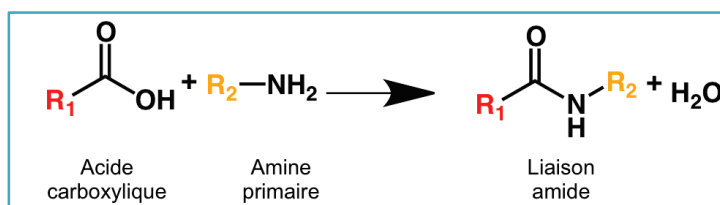


Figure 2-4 : Réaction de couplage peptidique

La déshydratation de ce sel peut intervenir directement à haute température (160-180°C) [80]. Toutefois, cette voie de formation des amides est très peu utilisée car elle nécessite des solvants à haute température d'ébullition, un chauffage important, et représente un risque de dégrader des réactifs tels que les protéines ou autres biomolécules. Ainsi, de nombreuses stratégies alternatives ont été développées afin de réaliser un couplage peptidique dans des conditions douces, sélectives et sans altérer les biomolécules à conjuguer [73], [79], [81]. Une des plus couramment utilisées consiste à activer l'acide carboxylique en espèce plus réactive.

2.3.1.1.2. ACTIVATION DE LA FONCTION ACIDE CARBOXYLIQUE

En biochimie, l'approche la plus traditionnelle pour activer un acide carboxylique est l'utilisation d'agents de couplage comportant la fonction carbodiimide afin de former un intermédiaire o-acylisourée. Cette espèce, très réactive et instable, peut réagir directement avec une amine pour former la liaison amide souhaitée. De par sa réactivité, l'intermédiaire peut toutefois réagir avec de nombreux autres nucléophiles, notamment l'eau, pour reformer l'acide carboxylique de départ. Une

solution pour augmenter le rendement de cette réaction consiste à faire réagir l'intermédiaire o-acylisourée avec un alcool électroattracteur pour former un ester « activé ». Le couple carbodiimide – alcool utilisé universellement dans le cadre de la bioconjugaison est le couple chlorhydrate de N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide (EDC) et N-hydroxysuccinimide (NHS) [82] (Figure 2-5). Ces espèces sont toutes deux solubles dans l'eau, l'ester-NHS obtenu est plus stable que l'intermédiaire o-acylisourée, résiste mieux à l'hydrolyse et est très réactif vis à vis des amines nucléophiles [73]. Après couplage ou hydrolyse, l'alcool-NHS est régénéré et peut alors être éliminé du milieu réactionnel.

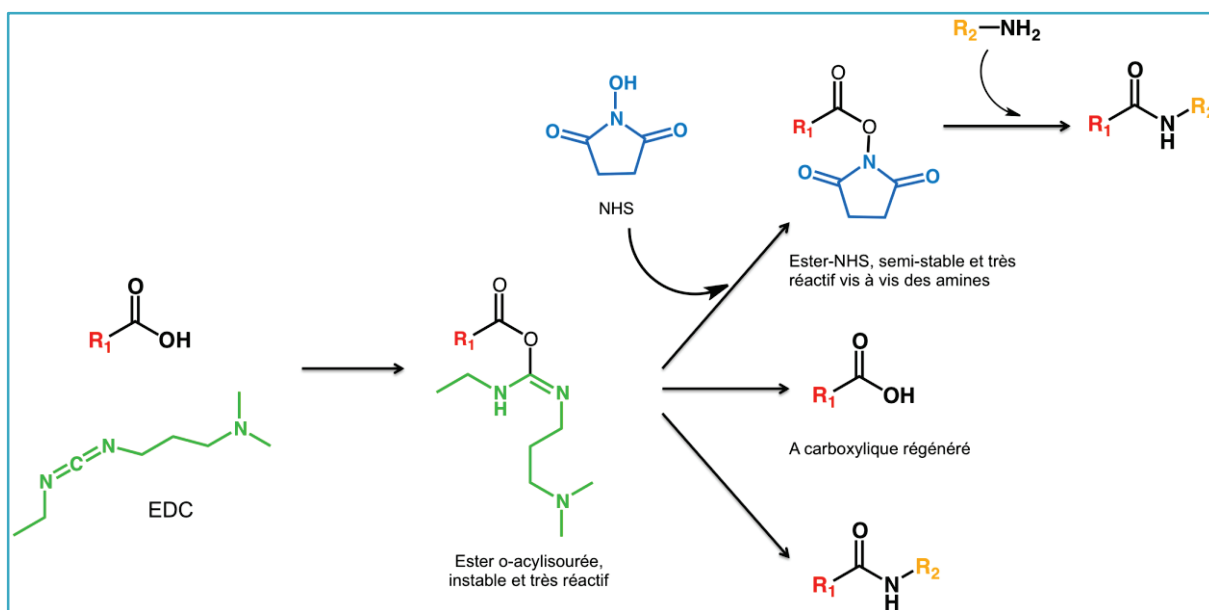


Figure 2-5 : Représentation schématique des réactions entre un acide carboxylique et une amine primaire, via activation par le couple EDC/NHS.

Le pH est un élément très important lors de ces réactions d'activation ou de couplage [83]. Le temps de demi-vie de l'ester-NHS vis à vis de l'hydrolyse décroît lorsque le pH augmente : il atteint environ 7,5 heures à pH 6,4 mais seulement une dizaine de minutes à pH 8,6 [84], [85]. La réactivité de l'ester augmente également avec le pH. Ainsi, l'idéal est de réaliser l'étape d'activation de l'acide carboxylique à un pH compris entre 4,5 et 7,2 et l'étape d'activation aux alentours de pH 7-8. Il est également possible de réaliser cette réaction en milieu organique dans des solvants aprotiques polaires tels que le diméthylformamide (DMF) ou le diméthylsulfoxyde (DMSO) [86]. Dans le cas où les espèces à conjuguer restent intègres dans ces conditions, le recours aux solvants organiques permet de limiter l'hydrolyse de l'ester et d'atteindre de meilleurs rendements.

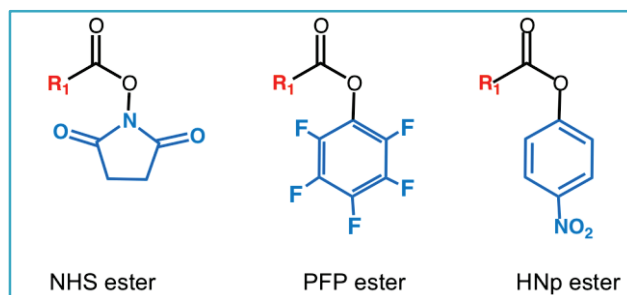


Figure 2-6 : Exemple d'esters activés

De nombreux autres esters activés ont été développés pour les réactions de couplage peptidique. Si le NHS est le plus couramment utilisé pour la conjugaison de peptides et de molécules bioactives, le *p*-nitrophénol (HNp) et le pentafluorophénol (PFP) sont avantageux dans le cadre de la synthèse peptidique. L'équipe de Kida *et al.* a étudié la stabilité et la réactivité de ces trois esters activés (Figure 2-6) en milieu aqueux [85]. Leurs résultats montrent que si les esters NHS s'hydrolysent rapidement à pH 6,4 et pH 7,4 avec des temps de demi-vie de 6,5 heures et 1,5 heures respectivement, les esters PFP et HNp atteignent moins de 10 % d'hydrolyse après 12 heures à pH 6,4 ou 7,4. En faisant réagir ces trois esters activés avec une amine primaire en léger excès (1,1 : 1), ils ont observé que la réactivité des esters HNp et NHS était équivalente avec respectivement 31% et 27 % de couplage, tandis que celle des esters PFP, atteignant 62 % de couplage, était bien supérieure.

Le choix de l'ester activé dépendra donc du contexte. Les esters NHS seront préférés pour des réactions en conditions douces, tandis que les esters PFP permettront, notamment en milieu organique, d'augmenter les rendements de couplages d'amines peu réactives.

2.3.1.2. STRATEGIE

L'utilisation de bras espaceurs homobifonctionnels a été une des premières stratégies développées dans le cadre de la modification et de la conjugaison des biomolécules. En 1966, Hartman et Wolf décrivent le premier agent de réticulation bifonctionnel imidazole ester pour le couplage des lysines des ribonucléases [87]. Aujourd'hui, une large gamme de réactifs homobifonctionnels est disponible commercialement. Ici, notre choix s'est porté sur un PEG bis carboxylique acide d'une masse molaire moyenne (M_n) de 250 g.mol⁻¹. Il s'agit du PEG de plus faible M_n disponible, avec un mélange de 2 ou 3 unités de répétition du motif éthylène glycol. De par sa petite taille, ce bras espaceur permet d'éviter une augmentation significative du diamètre hydrodynamique des nanoparticules et ainsi de favoriser la conservation de leur élimination par voie rénale. Après activation des fonctions acides carboxyliques par le couple EDC/NHS, une extrémité de la chaîne réagit avec les amines issues des APTES tandis que l'autre extrémité reste disponible pour un futur couplage covalent (Figure 2-7).

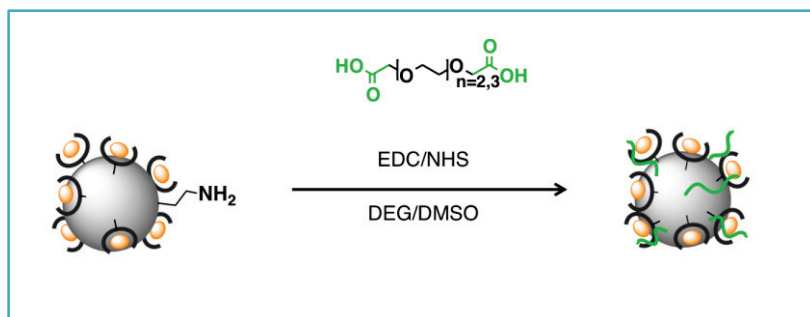


Figure 2-7 : Schéma réactionnel de l'ajout des bras espaceurs PEG sur les nanoparticules AGuIX

PROTOCOLE

Les nanoparticules AGuIX lyophilisées sont redispersées dans l'eau à une concentration de 500 mM en Gd^{3+} , puis diluées par 10 dans du diéthylène glycol (DEG) à 80°C. En parallèle, les molécules de HOOC-PEG-COOH sont diluées à 100 mM dans du DMSO anhydre puis activées par 10 équivalents de EDC et 20 équivalents de NHS, sous agitation magnétique à température ambiante pendant 30 minutes. Cette solution est ensuite ajoutée à la suspension de nanoparticules au ratio molaire de 3 équivalents de HOOC-PEG-COOH pour 1 équivalent de Gd^{3+} et le mélange est placé à température ambiante sous agitation magnétique pendant 12 heures. Enfin, la solution est diluée dans l'eau pour atteindre une concentration volumique en DMSO inférieure à 5% puis purifiée sur membrane Vivaspinn de seuil de coupure de 5 kDa jusqu'à l'obtention d'un taux de purification supérieur à 10 000. Pour les 5 premiers cycles de purification, le pH est réglé à 2 afin de protoner les fonctions acides carboxyliques des chaînes de PEG et d'éviter leur accroche aux amines des nanoparticules par interaction électrostatique. Cette étape permet d'éliminer du milieu réactionnel les nanoparticules dégradées, les agents de couplages et les chaînes de PEG n'ayant pas réagi. Les nanoparticules AGuIX@PEG obtenues sont ensuite lyophilisées.

2.3.1.3. CARACTERISATIONS

Le couplage des chaînes de PEG sur les nanoparticules AGuIX a pour conséquence une très légère augmentation de leur diamètre hydrodynamique D_H de $2,7 \pm 0,7$ nm vers $2,9 \pm 0,9$ nm (Figure 2-8). La répartition globale (en volume) observée par DLS indique que cette étape de couplage permet de conserver des nanoparticules de petite taille, propices à une élimination par voie rénale.

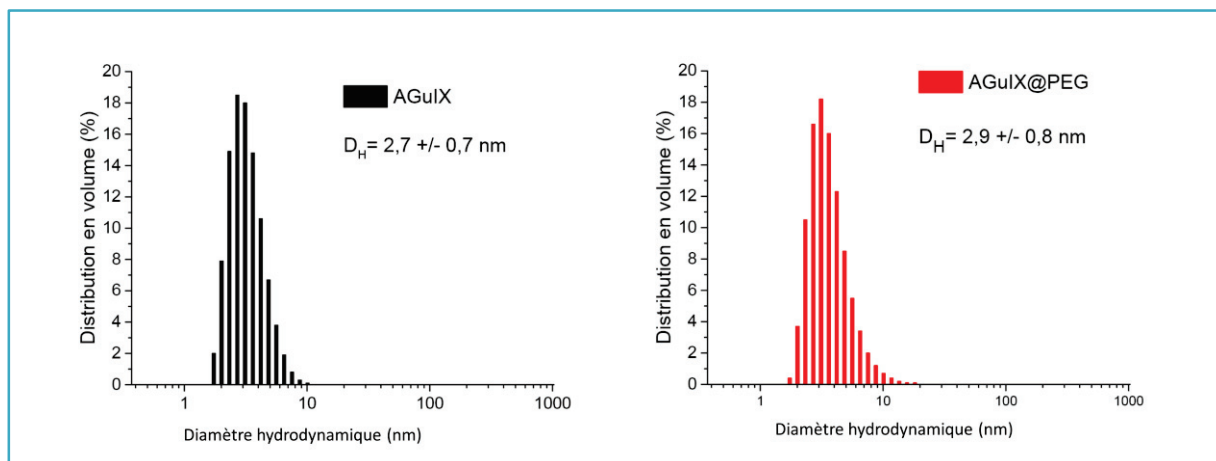


Figure 2-8 : Comparaison des diamètres hydrodynamiques D_H (nm) entre les nanoparticules AGuIX de départ et les AGuIX@PEG à une concentration de 10 mM en Gd^{3+} dans l'eau, (mesures réalisées avec un Granulomètre NanoZS ($\lambda=633$ nm)).

Un décalage plus significatif est observé en HPLC où le temps de rétention t_r des nanoparticules, de 10,0 min pour les AGuIX de départ, atteint la valeur de 11,4 min pour les AGuIX@PEG (Figure 2-9). Or le temps de rétention des nanoparticules sur cette colonne apolaire C4 dépend à la fois de la taille et de la nature de la surface des objets. Ainsi, ce décalage de t_r révèle que la surface des nanoparticules a bien été modifiée lors de l'étape de couplage des chaînes de polyéthylène glycol.

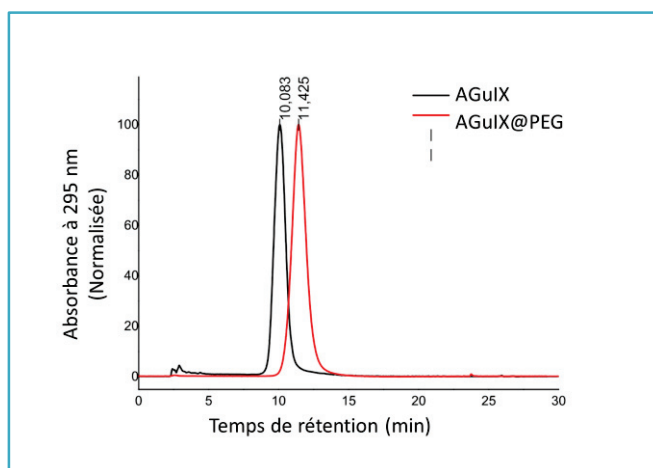


Figure 2-9 : Chromatogrammes des AGuIX et AGuIX@PEG avec détection UV-Visible à 295 nm.

De plus, comme vu dans la partie §1.4.3.1, la relaxivité r_i est fonction de la taille et de la rigidité des objets paramagnétiques. Or, après ajout des chaînes de polyéthylène glycol, on observe bien une augmentation relative des relaxivités longitudinales et transversales des AGuIX@PEG par rapport aux Nps de départ (

Tableau 2-4), en accord avec une augmentation de la masse des objets obtenus [13].

Tableau 2-4 : Relaxivités longitudinales et transversales des nanoparticules AGuIX et AGuIX@PEG à 60 MHz et 37°C et le ratio entre leurs relaxivités transversales et longitudinales

	AGuIX	AGuIX@PEG
$r_1(\text{s}^{-1}.\text{mM}^{-1})$	10,0	12,0
$r_2(\text{s}^{-1}.\text{mM}^{-1})$	13,6	18,7
$r_1(\text{s}^{-1}.\text{mM}^{-1})$	10,0	12,0
$r_2(\text{s}^{-1}.\text{mM}^{-1})$	13,6	18,7
r_2/r_1	1,4	1,6

Afin d'assurer que ces modifications de taille, de temps de rétention et de relaxivité sont bien dues à l'introduction de fonctions acides carboxyliques à la surface des nanoparticules AGuIX, nous avons réalisé les spectres infrarouges des Nps avant et après couplage des chaînes de PEG (Figure 2-9). En FTIR, les bandes d'absorptions des groupements carboxyliques dépendent de leur état protoné ou non (Figure 2-8), [88].

(i) Sous leur forme protonée $-\text{COOH}$, deux bandes caractéristiques sont observées : la bande d'élongation $\nu(\text{C}=\text{O})$ comprise entre 1690 cm^{-1} et 1750 cm^{-1} , et la bande de déformation $\nu(\text{C}-\text{O}-\text{H})$ aux alentours de $1200 - 1300\text{ cm}^{-1}$.

(ii) Sous leur forme carboxylate $-\text{COO}^-$, ces deux bandes caractéristiques sont décalées : vers des plus basses énergies dans le cas de la vibration du $\nu(\text{COO}^-)$ asymétrique ($1540 - 1650\text{ cm}^{-1}$) et vers des plus hautes énergies pour la vibration du $\nu(\text{COO}^-)$ symétrique.

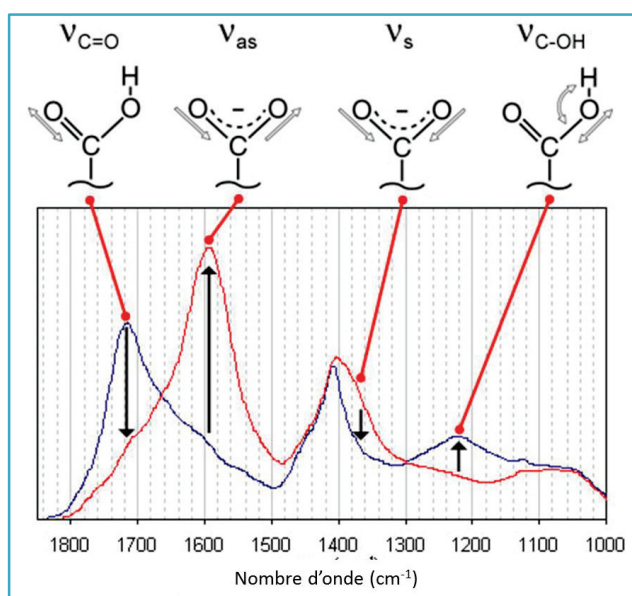


Figure 2-8 : Spectres infrarouges de l'acide fulvique à pH 2 (en rouge) et à pH 6 (en bleu). Adapté de

<http://geoweb.princeton.edu/research/geochemistry/research/organics-carboxyl.html>, consulté le 7 Juillet 2015).

Afin d'éviter le recouvrement de la bande de vibration du $\nu(\text{COO}^-)$ asymétrique avec celle de vibration du $\nu(\text{C=O})$ des amides ($1600 - 1690 \text{ cm}^{-1}$), les spectres infrarouges des nanoparticules AGuIX et AGuIX@PEG furent réalisés sous forme protonée après avoir été séchées à pH 2 à 80°C pendant 12 heures (Figure 2-9).

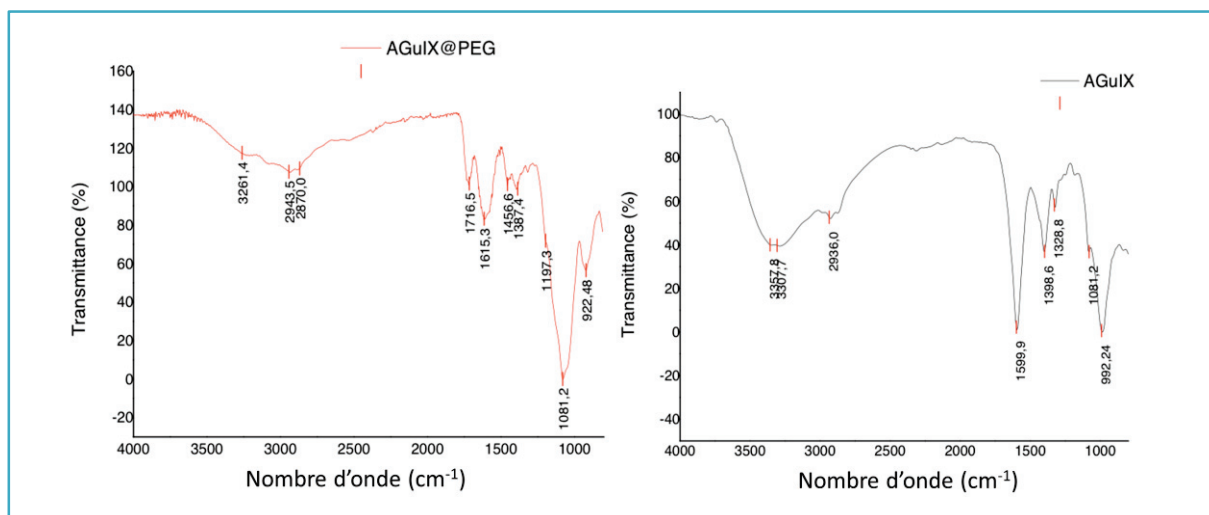


Figure 2-9 : Spectres infrarouges des AGuIX et AGuIX@PEG réalisés sur échantillons séchés à 80°C à pH = 2.

L'analyse du spectre infrarouge des AGuIX@PEG [89] révèle l'apparition d'une bande à 1716 cm^{-1} (Tableau 2-5), absente dans le spectre des AGuIX de départ. Cette bande est caractéristique de la fréquence d'élongation $\nu(\text{C=O})$ des acides carboxyliques. Son apparition apporte la preuve que les modifications observées sont bien dues à l'introduction de groupements acides carboxyliques à la surface des nanoparticules AGuIX.

Tableau 2-5 : Attribution des pics FTIR des AGuIX et AGuIX@PEG [89].

AGuIX		AGuIX@PEG	
Nombre d'onde (cm^{-1})	Attribution	Nombre d'onde (cm^{-1})	Attribution
3357	Si-OH	3261,5	Si-OH
3308	N-H amide	2945	-CH ₂
2936	-CH ₂	1716	C=O, COOH
1600	C=O amide	1615	C=O amide
1399	N-H amide	1456	C-O acide carboxylique
1328	C-H ; CH ₃	1387	N-H amide
1081	Si-O-Si	1197	C-O-C
992	Si-OH	1081	Si-O-Si

Afin de quantifier le nombre de groupements –COOH greffés, une formule brute est proposée pour les AGuIX@PEG à partir des résultats d'analyse élémentaire (Tableau 2-6) et du dosage des amines libres (AGuIX@PEG: 1,15 NH₂/Gd³⁺), selon le même protocole que décrit précédemment :

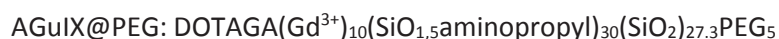


Tableau 2-6 : Résultats d'analyse élémentaire réalisée sur les AGuIX et les AGuIX@PEG

		Gd	Si	C	N
Rapport molaire par rapport à une mole de Gd³⁺	AGuIX	1	4.9	26.6	6.5
	AGuIX@PEG	1	5.7	33.2	7.1
Rapport massique exp (%)	AGuIX@PEG	11.4	11.7	28.9	7.2
Rapport massique théo (%)	AGuIX@PEG	11.5	11.7	28.6	7.2

En observant de plus près les rapports molaires des AGuIX et AGuIX@PEG, on remarque que le ratio silice sur gadolinium augmente après PEGylation, ce qui indique qu'une partie des groupements DOTAGA(Gd³⁺) aurait été décrochée lors des étapes de synthèse et de purification. L'augmentation relative du ratio carbone sur gadolinium est quant à elle en accord avec l'ajout de chaîne PEGylées sur les Nps.

D'après la formule brute proposée, cette voie de synthèse nous permet d'introduire environ 5 fonctions acides carboxyliques à la surface des nanoparticules AGuIX, qui seront ainsi disponible pour le couplage de vecteurs ciblant.

2.3.2. AJOUT DE FONCTIONS THIOLS

Les fonctions thiols se rencontrent très couramment chez les biomolécules. Elles permettent notamment de former des ponts disulfures entre deux acides aminés cystéines et participent ainsi à la structure tridimensionnelle des protéines et anticorps. Dans le cadre de la thèse, les fonctions thiols ont été utilisées pour fonctionnaliser les nanoparticules avec des dérivés lactosylés.

Afin d'introduire ces fonctions à la surface des nanoparticules AGuIX, deux voies ont été explorées : (i) *via* le réactif de Traut's ; (ii) *via* le greffage de bras espaceurs PEG à haut poids moléculaire (2,1 kDa ou 3,5 kDa). Ces nanoparticules AGuIX@SH ont été développées lors du stage de Master 2 de Mlle Morgane Bonnel, sous ma supervision et celle de M. François Lux (MCF).

En suspension, les nanoparticules AGuIX@SH risquent de s'oligomériser par formation de ponts disulfures entre les différentes fonctions thiols. Pour éviter la formation de ce type de liaison, du tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) peut être ajouté à la suspension de nanoparticules afin de réduire les ponts S-S et de stabiliser les fonctions thiols (Figure 2-10) [90] .

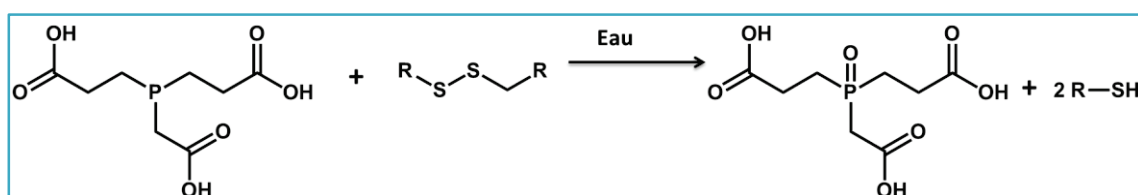


Figure 2-10 : Réduction d'un pont disulfure par le TCEP.

Ainsi, lors de la réalisation des différentes analyses sur les AGuIX@SH (HPLC, DLS, relaxométrie, ...) du TCEP sera systématiquement ajouté à la solution ([TCEP]=1 mM).

2.3.2.1. AJOUT DE THIOLS *VIA* LE REACTIF DE TRAUT'S

Le réactif de Traut's ou 2-iminothiolane permet l'ajout de fonctionnalités thiol à partir d'amines primaires [91] (Figure 2-11) sans recourir à des agents de couplage. Toutefois, il est fortement conseillé d'ajouter de l'EDTA au milieu réactionnel afin de prévenir l'oxydation des thiols en ponts disulfure. Ce composé est parfaitement soluble en milieu aqueux et réagit avec les amines nucléophiles dans une gamme de pH de 7 à 10.

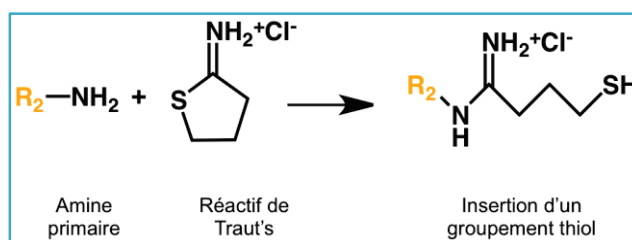


Figure 2-11 : Réaction d'ouverture de cycle entre le réactif de Traut's et une amine primaire

2.3.2.1.1. PARTIE EXPERIMENTALE

La réaction a lieu dans un tampon PBS à 0.1 M à pH 8 en présence d'EDTA à 1 mM. Les nanoparticules lyophilisées sont redispersées à 50 mM en Gd^{3+} directement dans cette solution tampon. Parallèlement, une solution de réactif de Traut's à 10 mg.mL^{-1} dans le PBS est préparée. 10 équivalents de celle-ci sont ajoutés à la suspension de Nps et le mélange est agité sous agitation magnétique à température ambiante pendant 1 heure. Le milieu réactionnel est ensuite purifié par filtration tangentielle sur membrane Vivaspin® d'un seuil de coupure de 5 kDa par ajouts successifs de solution tampon jusqu'à l'obtention d'un taux de purification supérieur à 10 000. Cette étape permet l'élimination des nanoparticules dégradées ainsi que des molécules de réactifs de Traut's n'ayant pas réagi.

2.3.2.1.2. CARACTERISATIONS QUALITATIVES DES AGuIX@TRAUT'S

Comme pour les nanoparticules AGuIX@COOH, les Nps obtenues sont caractérisées par granulométrie, HPLC et relaxométrie.

Tout d'abord, il apparaît que le diamètre hydrodynamique D_H des AGuIX@Traut's en présence de TCEP augmente de $3,7 \pm 0,8 \text{ nm}$ à $5,6 \pm 1,0 \text{ nm}$ (Figure 2-12), de même, le temps de rétention en HPLC est décalé de 12,9 minutes à 13,4 minutes. Enfin, la vitesse de relaxation longitudinale r_1 de ces nanoparticules est plus importante que pour les Nps de départ ($10,4 \text{ s}^{-1}.\text{mM}^{-1}$) et atteint $12,6 \text{ s}^{-1}.\text{mM}^{-1}$ à 60 MHz à 37°C.

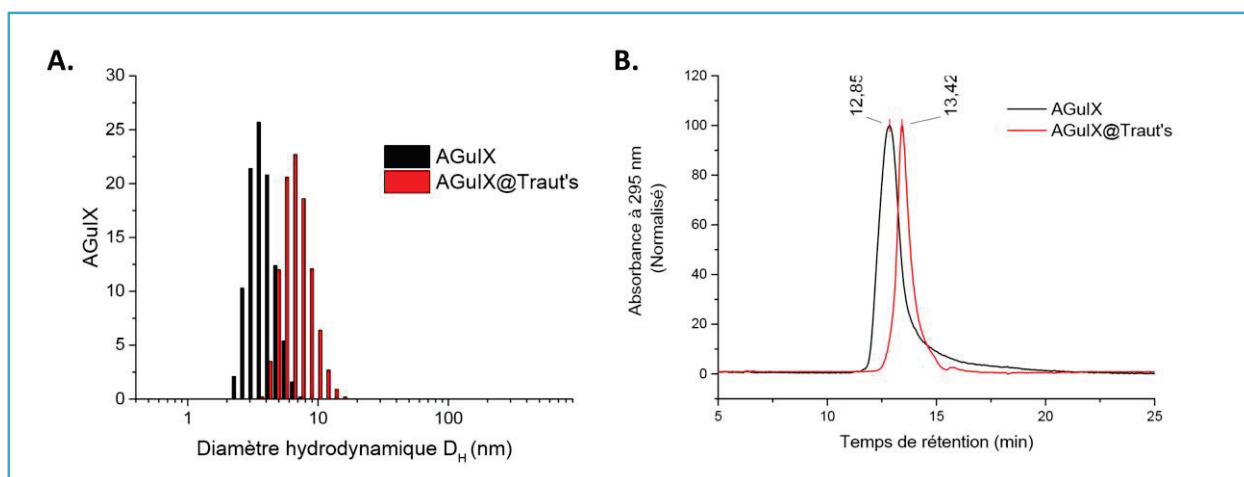


Figure 2-12: Caractérisations qualitatives du greffage du réactif de Traut's sur les nanoparticules AGuIX: Augmentation relative A. du diamètre hydrodynamique D_H de 3.7 nm à 5.6 nm (NanoZS $\lambda=633 \text{ nm}$); B. du temps de rétention en HPLC avec détection UV-Visible à 295 nm de 12,8 minutes à 13,4 minutes.

Ces trois analyses sont en accord avec une modification de la surface des nanoparticules AGuIX par le réactif de Traut's.

2.3.2.2. INTRODUCTION DE FONCTIONS THIOLS VIA L'AJOUT DE BRAS ESPACEURS PEG A HAUT POIDS MOLECULAIRE.

La deuxième stratégie mise en place afin d'introduire des fonctions thiols à la surface des nanoparticules consiste à greffer des chaînes hétérobifonctionnelles de polyéthylène glycol à haut poids moléculaire (2,1 kDa ou 3,5 kDa respectivement). Une des extrémités des chaînes PEG possède une fonction acide carboxylique qui peut réagir avec les amines primaires issues du réseau de polysiloxane selon le même protocole que pour le greffage covalent des HOOC-PEG-COOH (Voir §2.3.1.2). L'autre extrémité possède, quant à elle, une fonction thiol pouvant former un pont disulfure ou réagir avec une entité maléimide.

2.3.2.2.1. PARTIE EXPERIMENTALE

Les nanoparticules AGuIX lyophilisées sont redispersées dans l'eau à une concentration de 500 mM en Gd^{3+} , puis diluées par 10 dans du diéthylène glycol (DEG) à 80°C. En parallèle, les molécules de HOOC-PEG-SH (2100 et 3500 Da respectivement) sont diluées à 100 mM dans du DMSO anhydre puis activées par 10 équivalents de EDC et 20 équivalents de NHS, sous agitation magnétique à température ambiante pendant 30 minutes. Cette solution est ensuite ajoutée à la suspension de nanoparticules au ratio molaire de 3 équivalents de HOOC-PEG-SH (2100 et 3500 Da respectivement) pour 1 équivalent de Gd^{3+} et le mélange est laissé à température ambiante sous agitation magnétique pendant 12 heures. Enfin, la solution est diluée dans l'eau pour atteindre une concentration volumique en DMSO inférieure à 5% puis purifiée sur membrane Vivaspine® de seuil de coupure de 10 kDa jusqu'à l'obtention d'un taux de purification supérieur à 10.000. Pour les 5 premiers cycles de purification, le pH est réglé à 2 afin de protoner les fonctions acides carboxyliques des chaînes de PEG et d'éviter leur accroche aux amines des nanoparticules par interaction électrostatique. Cette étape permet d'éliminer du milieu réactionnel les nanoparticules dégradées, les agents de couplages et les chaînes de PEG n'ayant pas réagi.

2.3.2.2.2. CARACTERISATIONS QUALITATIVES DES AGuIX@PEG-SH

Les PEG-SH greffés ici aux nanoparticules AGuIX présentent un haut poids moléculaire (2 100 Da ou 3 500 Da) en comparaison avec les chaînes HOOC-PEG-COOH greffées précédemment (250 Da). Ainsi, cette modification de surface a pour effet un décalage significatif du diamètre hydrodynamique des nanoparticules de $3,7 \pm 0,8$ nm à $5,6 \pm 2,0$ nm pour les AGuIX@PEG₂₁₀₀-SH et jusqu'à $8,6 \pm 2,2$ nm pour les AGuIX@PEG₃₅₀₀-SH (Figure 2-14).

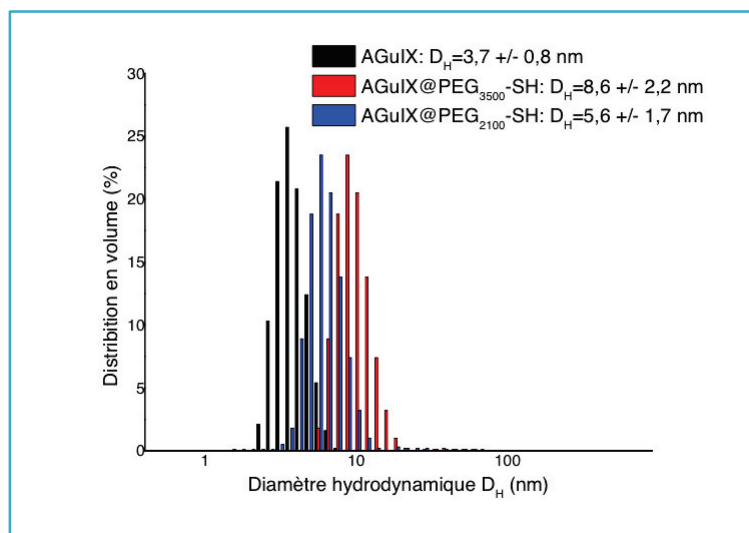


Figure 2-14 : Augmentations relatives du diamètre hydrodynamique des nanoparticules AGuIX@PEG-SH (2100 Da ou 3500 Da), mesurées par granulométrie à l'aide d'un NanoZS ($\lambda=633$ nm)

De même, leur temps de rétention est largement décalé et passe de 10,3 minutes à 15,5 minutes pour les AGuIX@PEG₂₁₀₀-SH et à 15,8 minutes pour les AGuIX@PEG₃₅₀₀-SH (Figure 2-13). Toutefois, dans le cas des nanoparticules fonctionnalisées par le PEG à 3500 Da, le chromatogramme révèle qu'une petite partie (Aire \approx 5%) des nanoparticules n'a pas été fonctionnalisée et présente toujours le même temps de rétention que les nanoparticules de départ.

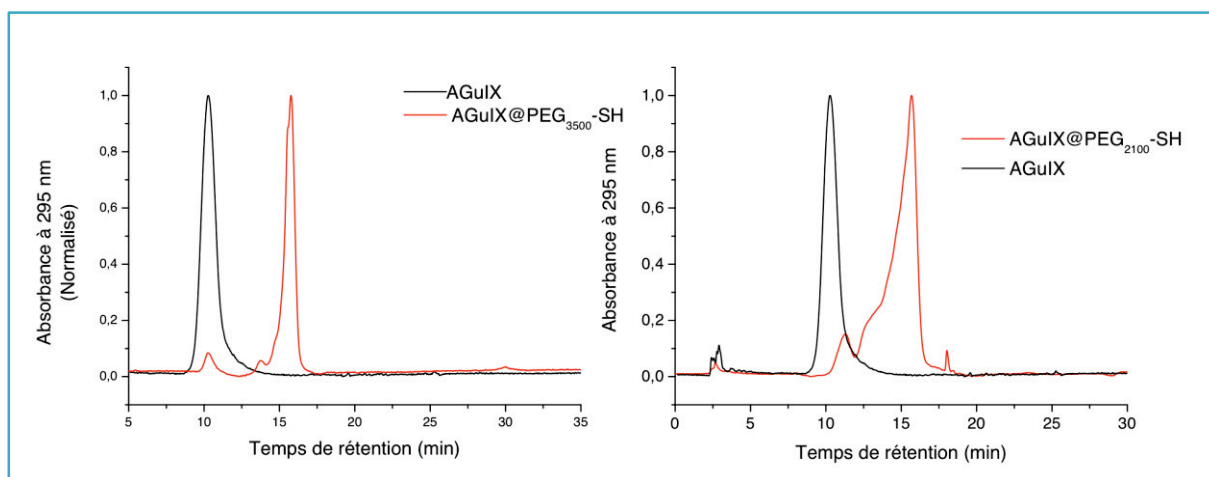


Figure 2-13 : Augmentation relative du temps de rétention des Nps en HPLC (détection UV-Visible à 295 nm) des AGuIX@PEG₃₅₀₀-SH (gauche) et des AGuIX@PEG₂₁₀₀-SH (droite).

Enfin, la vitesse de relaxation des AGuIX@PEG-SH augmente également de manière significative jusqu'à la valeur de r_1 de $14,2 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ pour les AGuIX@PEG₂₁₀₀-SH et de $15,9 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ pour les AGuIX@PEG₃₅₀₀-SH à 60 MHz à 37°C. Ainsi, les nanoparticules semblent bien avoir été

fonctionnalisées par chacun des PEG-SH. Ces nanoparticules ont également été caractérisées par infrarouge (Figure 2-15), le spectre obtenu a été comparé à celui des PEG-SH et des particules AGuIX.

Avant de réaliser les spectres, le pH des solutions est réglé à 2 afin de protoner les fonctions acides carboxyliques issues des HOOC-PEG-SH.

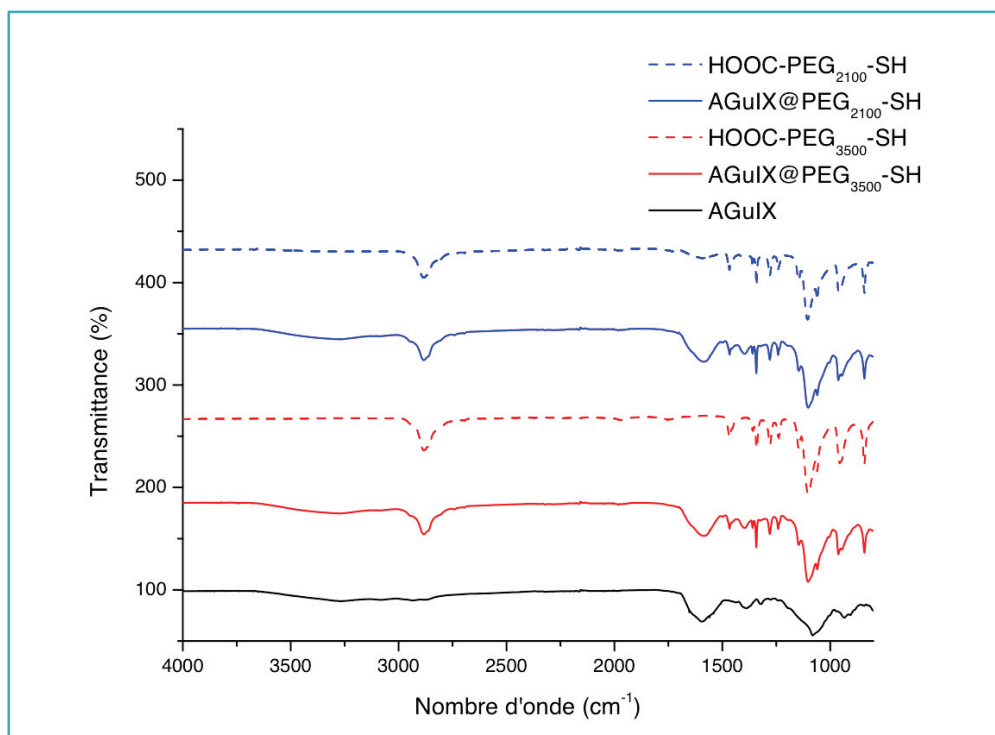


Figure 2-15 : Spectres infrarouges des différents composés

Les PEG ainsi que les AGuIX@PEG-SH présentent tous deux un pic intense à 2883 cm^{-1} , caractéristique des vibrations d'élongation des $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ des carbones issus des motifs éthylène glycol, un pic de faible aire à 2740 cm^{-1} caractéristique de l'élongation des S-H. Les AGuIX@PEG-SH et les AGuIX partagent quant à elle un pic large aux alentours de 1600 cm^{-1} , caractéristique cette fois-ci des vibrations du C=O de la liaison amide.

Ces différents pics prouvent que les modifications observées en DLS, HPLC et relaxométrie sont bien dues à l'introduction de fonction thiol à la surface des nanoparticules AGuIX.

2.3.2.3. QUANTIFICATION DU NOMBRE DE FONCTIONS THIOL INTRODUITES

Afin de quantifier le nombre de fonctions thiols introduites à la surface des nanoparticules *via* chacune des stratégies, deux types de quantifications colorimétriques ont été mises en place : (i) *via* le dosage par le réactif de Ellman ; (ii) *via* la réaction d'un chromophore-maléimide.

2.3.2.3.1. VIA LE TEST D'ELLMAN

L'acide 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoïque) ou réactif de Ellman est un composé soluble et bon marché développé dès 1959 pour la quantification des thiols en solution [92], [93]. En présence d'un composé thiol, ce dimère (DTNB) se coupe par échange de pont disulfure pour former le monomère TBN⁻ qui présente une forte absorption à 412 nm (Figure 2-16). A pH 8, le coefficient d'extinction molaire du TNB⁻ à 412 nm est de 13 600 M⁻¹.cm⁻¹ [73].

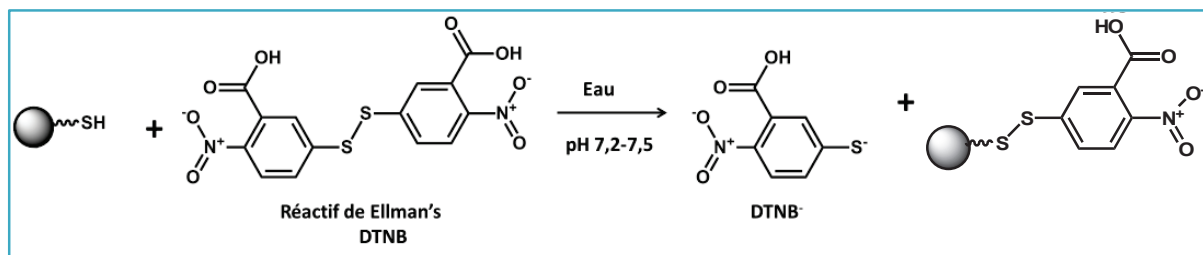


Figure 2-16 : La réaction du réactif d'Ellman avec un composé thiol forme le monomère TNB⁻, quantifié par son absorbance à 412 nm.

Protocole

Un étalonnage est réalisé dans un tampon bicarbonate de soude à pH 8 à partir de chaque espèce soufrée : le HOOC-PEG-SH et le réactif de Traut's respectivement (Figure 2-17). Le réactif de Traut's réagit préalablement avec un excès de propylamine afin de procéder à l'ouverture de son cycle et de rendre sa fonction thiol disponible (Figure 2-11). Les nanoparticules AGuIX absorbant aux alentours du maximum d'absorption du monomère TNB⁻, des concentrations croissantes en Nps ont été introduites dans les différents étalons. Dans chaque tube contenant une concentration en espèce

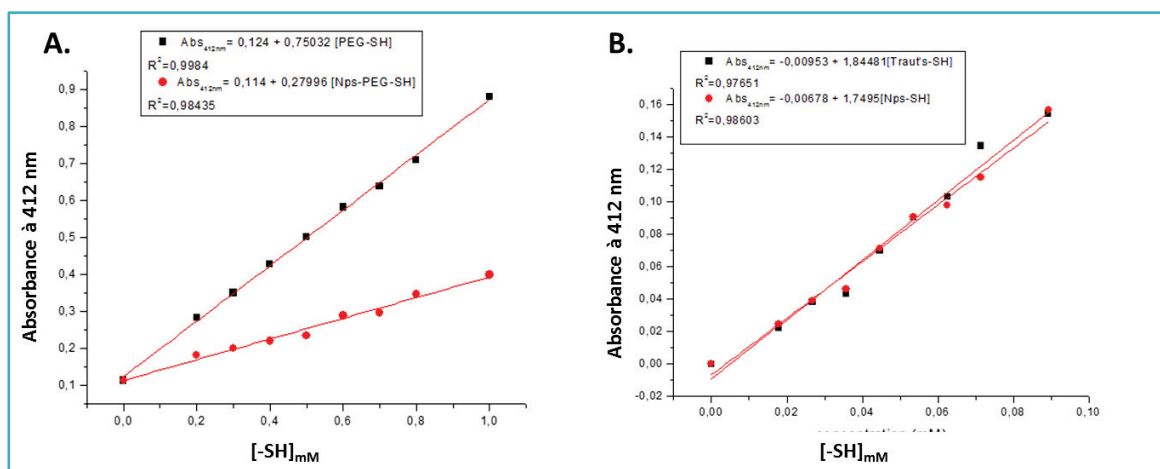


Figure 2-17 : A. Dosage des AGuIX@PEG-SH à partir de la droite d'étalonnage des PEG-SH en présence de nanoparticules ; B. Dosage des AGuIX@Traut's à partir de la droite d'étalonnage du réactif de Traut's ayant réagi avec de la propylamine

soufrée connue ($V = 250 \mu\text{L}$), $50 \mu\text{M}$ de solution de réactif d'Ellman à 4 mg.mL^{-1} sont ajoutés. Le mélange réagit à température ambiante pendant 15 minutes avant d'être analysé par spectroscopie UV-Visible. Les nanoparticules à tester réagissent avec le réactif d'Ellman selon le même protocole.

Résultats

Le dosage des thiols par le réactif d'Ellman confirme bien l'introduction de fonctions thiols à la surface des nanoparticules. Pour les AGuIX@PEG environ 4 à 5 chaînes hétérobifonctionnelles ont été introduites contre environ 10 molécules de Traut's dans le cas des AGuIX@Traut's. (Tableau 2-7).

Tableau 2-7 : Nombre de fonctions thiols introduites d'après de dosage de Ellman

	AGuIX@Traut's	AGuIX@PEG ₂₁₀₀ -SH	AGuIX@PEG ₃₅₀₀ -SH
Nb de fonctions thiols introduites par Np d'après de dosage de Ellman	1 SH/Gd ³⁺	0,5 SH/Gd ³⁺	0,4 SH/Gd ³⁺

2.3.2.3.2. VIA L'ABSORPTION DU DABMI-MALEIMIDE.

Les thiols réagissent sélectivement avec les fonctions maléimides pour former une liaison covalente stable. Or le 4-diméthylaminophénylazophényl-4'-maléimide, ou DABMI-maléimide, est une molécule absorbant fortement aux alentours de 420 nm, avec un coefficient d'extinction molaire ϵ ($\lambda = 419 \text{ nm}$) supérieur à $30\,000 \text{ cm}^{-1}.\text{M}^{-1}$ [94].

Ainsi, pour confirmer les résultats de quantification des fonctions thiols obtenus par le dosage d'Ellman, nous avons conjugué des molécules de DABMI-maléimide aux différentes AGuIX@SH (Figure 2-18).

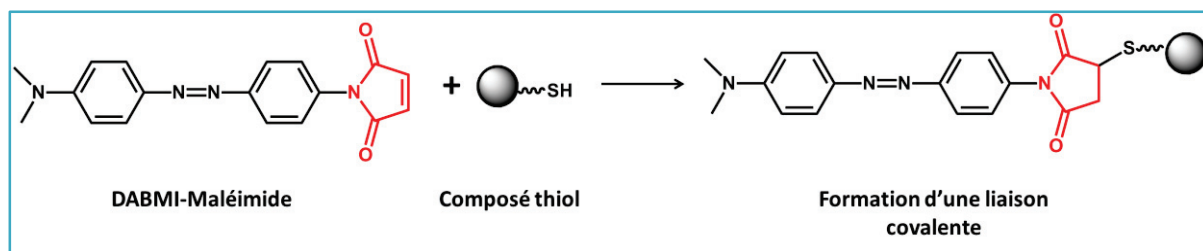


Figure 2-18 : Schéma réactionnel de la réaction de couplage covalent entre les AGuIX@SH et le réactif DABMI-Maléimide

Réalisation de la gamme étalon

La longueur d'onde et l'intensité d'absorption maximales du DABMI dépendent du solvant et de la conjugaison ou non de la fonction maléimide. Comme observé sur la Figure 2-19, la conjugaison du maléimide a pour effet un décalage de 398 nm vers 419 nm de la longueur d'onde d'absorption maximale. Une gamme étalon a donc été réalisée en faisant réagir les composés thiols (PEG ou réactif de Traut's) en excès sur le DABMI-maléimide dans l'éthanol. Ce solvant a été choisi pour sa capacité à disperser à la fois les nanoparticules, très hydrophiles, et le composé DABMI, quant à lui très hydrophobe.

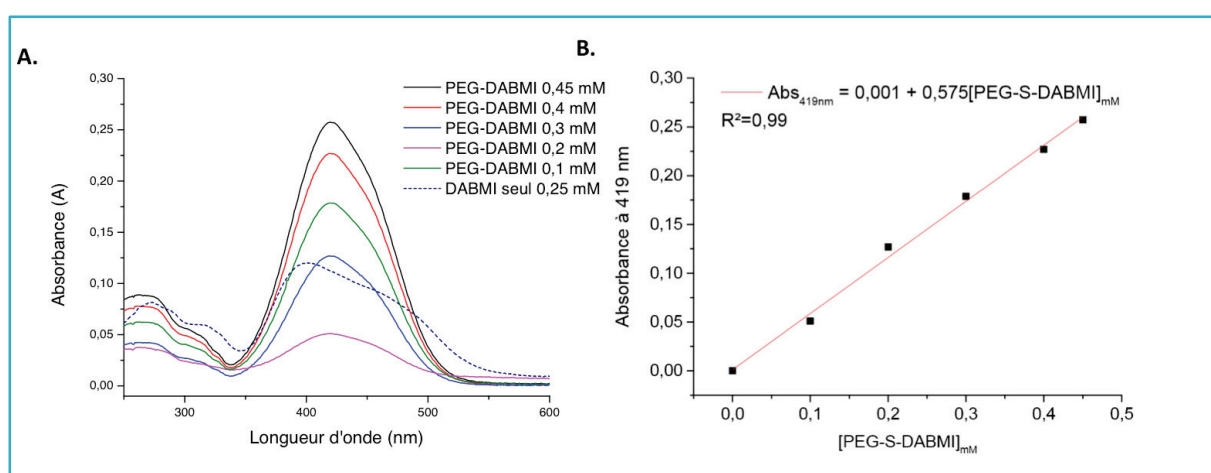


Figure 2-19 : Spectres d'absorption des étalons PEG-S-DABMI dans l'éthanol à différentes concentrations, B. Droite étalon correspondant à l'absorption à 419 nm en fonction de la concentration en PEG-S-DABMI.

Synthèse des AGuIX@S-DABMI

Les nanoparticules AGuIX lyophilisées sont redispersées dans l'eau à une concentration de 500 mM en Gd^{3+} , puis diluées par 10 dans du diéthylène glycol (DEG) à 80°C, puis dans le DMSO jusqu'à atteindre une concentration de 25 mM en Gd^{3+} . 10 équivalents de DABMI-Maléimide en solution dans le DMSO anhydre à 100 mg.mL⁻¹ sont ajoutés goutte à goutte à cette solution et le milieu réagit pendant 2 heures à température ambiante sous agitation magnétique. Les nanoparticules sont alors précipitées dans un volume d'acétone égal à 4 fois le volume du milieu réactionnel. Après centrifugation à 2500 rpm pendant 5 minutes, le surnageant est éliminé du milieu. Cette opération est répétée 4 fois, ou jusqu'à l'obtention d'un surnageant incolore. Enfin, les nanoparticules précipitées sont redispersées dans l'eau puis purifiées par filtration tangentielle sur membrane Vivaspine® jusqu'à l'obtention d'un surnageant limpide.

Résultats

Le dosage des nanoparticules AGuIX@PEG-SH a été réalisé à différentes concentrations d'après la droite étalon ci-dessus, et indique qu'environ 0,44 fonctions thiols par Gd^{3+} (4,4/Np) ont été introduites sur les nanoparticules. Les AGuIX@Traut's n'ont quant à elles pas pu être quantifiées *via* cette méthode. En effet, l'étape de purification en milieu aqueux cause la précipitation de ces Nps. Il semble que le caractère hydrophobe induit par les molécules de DABMI puisse être compensé par la présence des chaînes de PEG hydrophiles dans le cas des AGuIX@PEG-SH, mais entraînent une précipitation des Nps AGuIX lorsque celui-ci est greffé au petit bras espaceur Traut's.

2.3.2.4. COMPARAISON DES DEUX TYPES DE NANOPARTICULES AGuIX@SH

Les différentes techniques d'analyses qualitatives (HPLC, relaxométrie et DLS) sont en accord et montrent que les deux voies de synthèses ont toutes deux permis l'introduction de fonctions thiols à la surface des nanoparticules AGuIX (Tableau 2-8).

Tableau 2-8 : Quantification du nombre de fonctions thiol introduites par équivalents d'ions gadolinium selon la méthode réalisée (DABMI-Maléimide ou Ellman).

Méthode de dosage	DABMI-Maléimide	Ellman
AGuIX@PEG ₃₅₀₀ -SH	0,44 SH/ Gd^{3+}	0,4 SH/ Gd^{3+}
AGuIX@PEG ₂₁₀₀ -SH	Non réalisé	0,5 SH/ Gd^{3+}
AGuIX@Traut's	Non applicable	1 SH/ Gd^{3+}

Le plus grand nombre de fonctions thiols introduites par le réactif de Traut's peut s'expliquer par des effets de gêne stérique. En effet, les chaînes de PEG présentent un haut poids moléculaire et peuvent être repliés en solutions. Au contraire, le réactif de Traut's, quant à lui de très petite taille, peut plus facilement atteindre les amines de surfaces des Nps AGuIX.

Ces résultats doivent être confirmés prochainement par des mesures d'analyses élémentaires afin de déterminer le nombre de fonctions thiols obtenus à partir du calcul de la formule brute de ces Nps.

2.3.3. CONCLUSION

Les différentes modifications de surface réalisées sur les nanoparticules AGuIX ont permis l'introduction de fonctions acides carboxyliques ou thiols. Ainsi, les nanoparticules présentent désormais des fonctions accessibles pour être vectorisées par différents ligands ciblant.

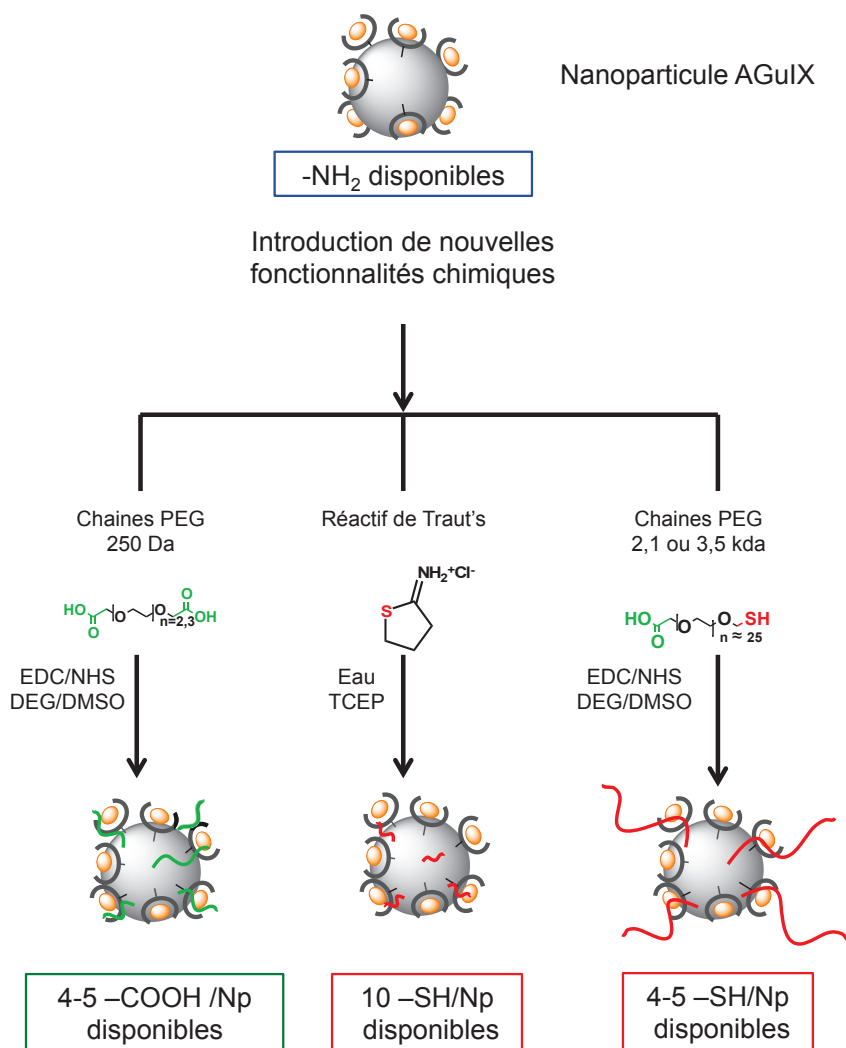


Figure 2-20 : Bilan du nombre de fonctions acides carboxyliques ou thiols introduites selon la stratégie mise en œuvre.

Les AGuIX@PEG-COOH pourront être utilisées pour la formation de liaison amide avec les amines primaires : (i) des N-terminaux de différents peptides ; (ii) d'acides aminés lysines ; (iii) de molécules organiques. Les différentes AGuIX@SH développées pourront quant à elles réagir avec d'autres fonctions thiols ou encore des composés maléimides.

2.4. MARQUAGE FLUORESCENT DES NANOPARTICULES

Le recours aux techniques de fluorescence est en constante augmentation dans le domaine des sciences du vivant et constitue désormais une des méthodes les plus couramment utilisées dans le domaine des biotechnologies avec des applications pour la cytométrie en flux, le séquençage de l'ADN, la médecine légale, l'étude des protéines, etc [95]. La fluorescence est une technique particulièrement sensible qui peut ainsi se substituer aux techniques d'analyse « historiques » utilisant des isotopes radioactifs.

2.4.1. PRINCIPE DE LA LUMINESCENCE

La luminescence représente la propriété de certaines substances chimiques de restituer une partie de l'énergie absorbée sous forme de lumière. Les processus entrant en jeu lors de ce phénomène sont décrits par le diagramme de Jablonski (Figure 2-21).

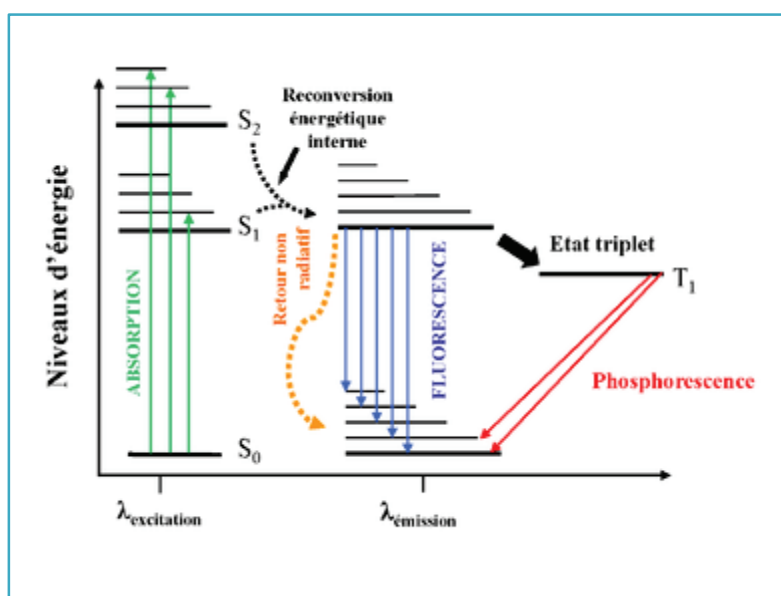


Figure 2-21 : Diagramme de Jablonski

Après excitation par un rayonnement lumineux, plusieurs voies de désexcitation sont possibles.

- Une désexcitation non-radiative (sans émission de lumière).
- Une désexcitation radiative à une longueur d'onde légèrement plus élevée que la longueur d'onde d'excitation (décalage de Stokes) : la fluorescence. Ce phénomène est particulièrement rapide (de 10⁻⁹ à 10⁻⁷ s). En général, les molécules organiques insaturées se désexcitent en partie *via* ce phénomène : on parle ainsi de fluorophore.

- Une conversion intersystème vers un état triplet T_1 : la phosphorescence. La durée de vie de ce phénomène est sensiblement plus longue que la fluorescence (de 10^{-6} à 1 s), ce qui permet de séparer la phosphorescence en temps résolu de la fluorescence d'autres espèces.
- Ce phénomène concerne également certains ions du bloc *f*. En effet, les ions trivalents de lanthanides, à l'exception du lanthane et du lutécium (La^{3+} et Lu^{3+}) présentent tous des propriétés de luminescence.

2.4.2. CHOIX DU FLUOROPHORE

Une très large gamme de fluorophores organiques est disponible commercialement. Chacune des molécules présente des propriétés spécifiques (Tableau 2-9). Les principales caractéristiques d'un fluorophore sont les suivantes [96]:

- Ses longueurs d'onde d'absorption et d'émission (nm) ;
- Sa capacité à absorber la lumière à une longueur d'onde donnée λ (nm), soit son coefficient d'extinction molaire $\varepsilon(\lambda)$ en $\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.
- Sa capacité à restituer l'énergie des photons absorbés sous forme de rayonnement lumineux, soit son rendement quantique de fluorescence ϕ défini selon l'équation suivante :

$$\phi = \frac{\text{nombre de photons émis}}{\text{nombre de photons absorbés}}$$

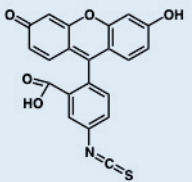
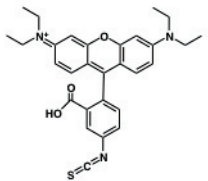
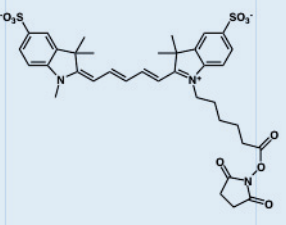
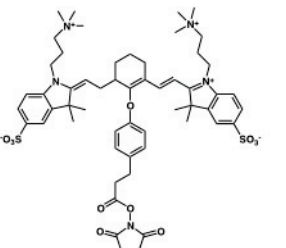
- Son intensité de fluorescence, également appelée brillance, définie selon le produit de son coefficient d'extinction molaire $\varepsilon(\lambda)$ et son rendement quantique de fluorescence ϕ .

$$I \sim \varepsilon(\lambda) * \phi$$

- La durée de vie de son état excité τ (s).
- Le décalage entre les longueurs d'onde d'absorption et d'émission : le déplacement de Stokes.

Pour des applications non *in vivo*, les fluorophores idéaux seront ceux présentant de bonnes propriétés d'absorbance et de rendement quantique, ainsi qu'un prix raisonnable. Le choix s'est donc porté sur la Rhodamine B et la Fluorescéine, qui absorbent et émettent dans la zone de 450-550 nm, ont un coefficient d'extinction molaire supérieur à $80\,000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, un rendement quantique supérieur à 50% et sont bon marché (moins de 100€ les 100 mg).

Tableau 2-9 : Caractéristiques des principaux fluorophores utilisés au cours de la thèse [96], [97, p. 8], [98].

Fluorophore	Structure moléculaire	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\varepsilon(\lambda_{\text{abs}})$ ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	Φ
Isothiocyanate de fluorescéine		495	517	80 103	0,84
Isothiocyanate de Rhodamine B		543	565	106 000	0,54
Cyanine 5,5 ester NHS		675	694	209 000	0,3
ZW800 ester NHS		772	788	249 000	0,15

Pour les applications *in vivo* en imagerie optique, le choix du fluorophore idéal ne répond pas aux mêmes critères. En effet, comme indiqué dans la partie §1.1.5, la principale limitation de cette technique d'imagerie vient de la faible pénétration de la lumière dans les tissus.

Ce phénomène d'absorption des photons par les différents constituants de la peau est minimal dans le proche infra-rouge (700-1000 nm). Ainsi, les molécules qui absorbent et émettent dans cette gamme de longueurs d'ondes pourront être excités plus efficacement et offrir un bon signal lors d'une imagerie optique *in vivo* sur le petit animal. La Cyanine_{5,5} (Cy5,5 : $\lambda_{\text{Absorbance max}} = 675 \text{ nm}$, $\varepsilon = 209\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $\lambda_{\text{Emission max}} = 694 \text{ nm}$, $\Phi = 0,3$) est ainsi utilisée depuis plusieurs années par l'équipe FENNEC comme fluorophore de choix pour le suivi *in vivo* des nanoparticules AGuIX en imagerie optique [2], [99]. Le ZW800, de par ses longueurs d'ondes d'absorption et d'émission, est également un fluorophore très prometteur pour des applications *in vivo* [97]. Actuellement, l'équipe de Jean-Luc Coll étudie le comportement *in vivo* des nanoparticules AGuIX marquées par l'un ou l'autre de ces

fluorophores par imagerie de fluorescence. Il faut noter qu'à ce jour, seules la fluorescéine et l'indocyanine green disposent d'une AMM.

2.4.3. PARTIE EXPERIMENTALE

La sensibilité de la fluorescence est telle qu'une faible concentration en fluorophore (μM ou nM) peut suffire pour obtenir un signal observable à la fois *in vitro* et *in vivo*. Au contraire, la sensibilité des agents de contraste en IRM est relativement faible et les concentrations en Gd^{3+} des solutions à injecter *in vivo* doivent être de l'ordre du mM pour obtenir un contraste suffisant. Dans l'objectif de réaliser une imagerie multimodale simultanée par IRM et imagerie optique, nous avons ainsi choisi de greffer un fluorophore pour 500, 1000 ou 2000 ions Gd^{3+} .

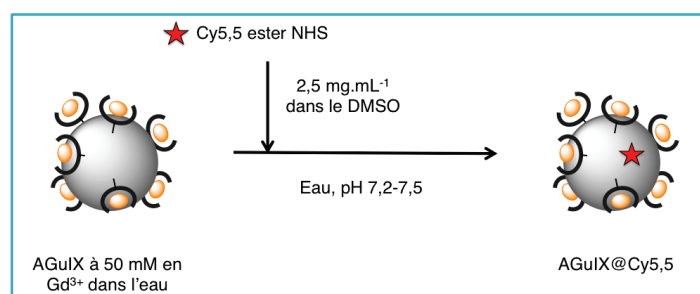


Figure 2-22 : Schéma réactionnel du greffage de la cyanine 5,5 – NHS sur les nanoparticules AGuIX.

De par leurs fonctions ester-NHS, la Cyanine 5,5 et le ZW800, forment, sans ajout d'agents de couplages, des liaisons covalentes avec les amines issues des APTES du réseau de polysiloxane (Figure 2-22). Le greffage des fluorophores Fluorescéine et Rhodamine B se produit par réaction entre leur fonction isothiocyanate et les mêmes amines primaires présentes sur les Nps AGuIX (Figure 2-23).

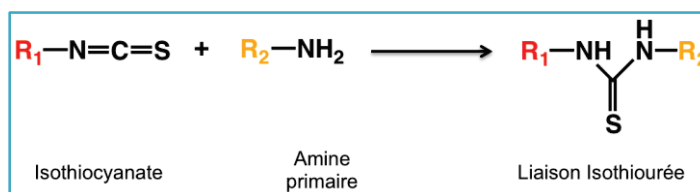


Figure 2-23 : Schéma réactionnel de la condensation entre un isothiocyanate et une amine primaire

Le greffage de ces quatre fluorophores s'effectue selon le protocole suivant :

Protocole

Les nanoparticules AGuIX lyophilisées sont redispersées à 50 mM en Gd^{3+} dans l'eau ultrapure et le pH est ajusté à 7,2-7,5 par ajout d'une solution de NaOH à 0,1 M. Le fluorophore est dilué à 2,5 mg.mL⁻¹ dans le DMSO anhydre. Le volume correspondant à la quantité souhaitée de fluorophore est ajouté au goutte à goutte à la suspension de nanoparticules. La suspension réagit alors sous agitation magnétique à température ambiante à l'abri de la lumière pendant 12 heures. Enfin, les nanoparticules sont purifiées sur membrane Vivaspine de 5 kDa jusqu'à obtention d'un taux de purification de minimum 100000. Cette étape permet d'éliminer efficacement les fluorophores qui n'auraient pas réagi ainsi que les sous-produits de réaction tels que le NHS hydrolysé ou les nanoparticules dégradées. Les nanoparticules peuvent alors être lyophilisées et sont stables plusieurs mois à température ambiante à l'abri de la lumière.

2.4.3.1. CARACTERISATION DES AGuIX@FLUOROPHORE

Les différentes caractérisations réalisées sur les AGuIX@Fluorophores seront ici décrites à travers l'exemple de la cyanine 5,5. Les nanoparticules AGuIX@Cy5,5 présentent un diamètre hydrodynamique de $2,4 \pm 0,9$ nm. En comparaison, le diamètre hydrodynamique des AGuIX non vectorisées du même lot était de $2,2 \pm 0,7$ nm (Figure 2-24). La vitesse de relaxation à 60 MHz des

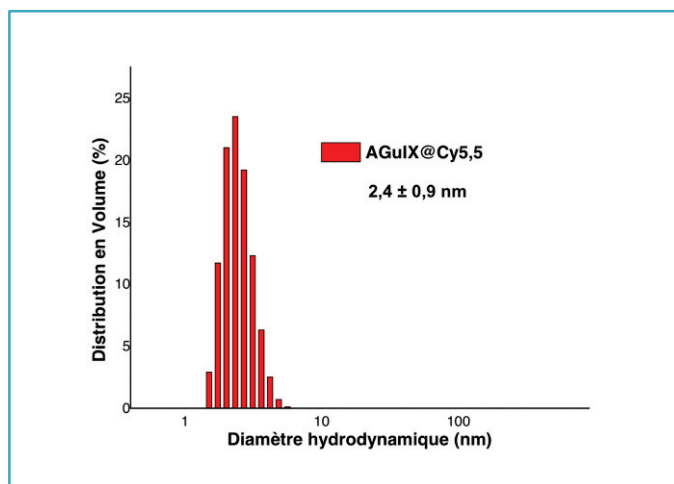


Figure 2-24 : Diamètre hydrodynamique des AGuIX@Cy5,5 mesuré par le Zetasizer (Laser $\lambda=532$ nm).

nanoparticules *post* greffage est également très proche de celle des nanoparticules de départ ($r_1=10,4 \pm s^{-1}.mM^{-1}$).

Les nanoparticules AGuIX et la cyanine 5,5 présentent chacune des longueurs d'ondes d'absorption et/ou d'émission caractéristiques ($\lambda_{abs,max} AGuIX = 295$ nm and $\lambda_{ex,max} cy5.5 = 675$ nm; $\lambda_{em,max} cy5.5 = 694$ nm). Ces longueurs d'ondes furent donc sélectionnées afin de détecter ces deux espèces par HPLC.

La détection de la fluorescence de la cyanine 5.5 indique que le fluorophore non greffé a un temps de rétention très long (environ 32 minutes) en accord avec son hydrophobicité importante. Le principal pic détecté par absorption UV-Visible à 295 nm présente un temps de rétention d'environ 11 minutes et correspond à la population de nanoparticules. Les AGuIX@Cy5,5 sont également détectées *via* la fluorescence de la cyanine au même temps de rétention que les nanoparticules sans observer de pic correspondant au fluorophore non greffé. La superposition des deux chromatogrammes obtenus par absorption et fluorescence constitue une preuve du greffage du fluorophore sur les nanoparticules.

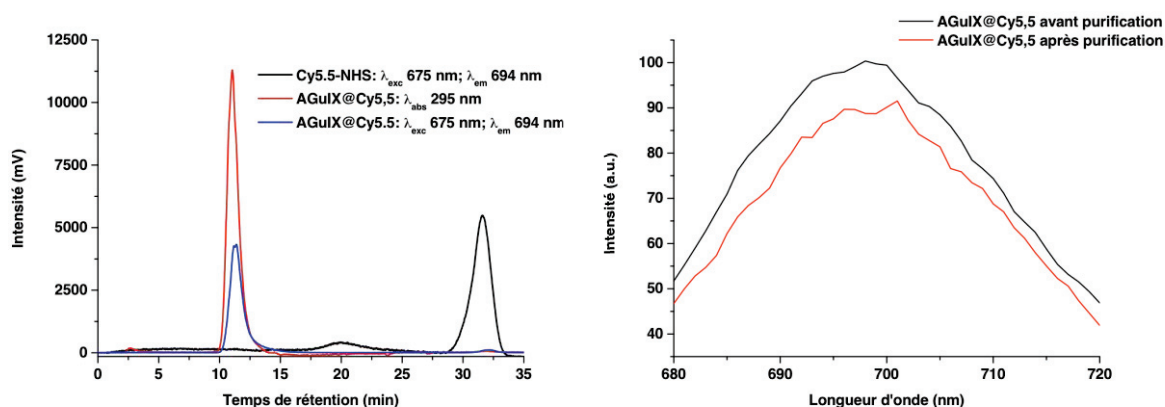


Figure 2-25 : Chromatogramme de la cyanine 5,5 NHS par détection en fluorescence ($\lambda_{\text{exc}} = 675 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 694 \text{ nm}$) et des AGuIX@Cy5,5 par absorption UV-Visible à 295 nm et par fluorescence ($\lambda_{\text{exc}} = 675 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 694 \text{ nm}$) (gauche).

Spectres de fluorescence des nanoparticules AGuIX@Cy5,5 avant et après purification : excitation à 675 nm et normalisation par la concentration en gadolinium mesurée par la phosphorescence du Gd^{3+} (droite).

Le rendement de greffage est déterminé à partir de la comparaison de l'intensité de fluorescence de la cyanine 5,5 avant et après élimination par filtration tangentielle des molécules n'ayant pas réagi et normalisation des spectres d'émission de fluorescence par rapport à l'intensité de phosphorescence du Gd^{3+} (Figure 2-25).

Le rendement du greffage de la cyanine 5,5 ester-NHS par rapport au Gd^{3+} est de 90 % (Figure 2-25). Ce bon rendement de greffage s'explique par le large excès de fonctions amines primaires issues des APTES par rapport aux esters NHS. Le rendement n'est toutefois pas total car une partie des esters NHS a pu s'hydrolyser lors de la réaction en milieu aqueux et certaines particules ont dû être dégradées et éliminées lors de l'étape de purification.

2.4.4. PUBLICATION : OROTRACHEAL ADMINISTRATION OF CONTRAST AGENTS : A NEW PROTOCOL FOR BRAIN TUMOR TARGETING

2.4.4.1. INTRODUCTION

De par la présence des ligands DOTAGA(Gd^{3+}) à leur surface, les nanoparticules AGuIX sont intrinsèquement des agents de contraste positifs. Il est donc possible de suivre leur biodistribution par IRM. Le marquage de ces objets par un fluorophore organique permet de corroborer ces informations grâce à la réalisation d'expériences d'histologie *post mortem*. Ainsi, les nanoparticules marquées à la cyanine 5,5 précédemment décrites, les AGuIX@Cy5,5, ont été utilisées dans le cadre de l'étude de la biodistribution des AGuIX par une voie d'administration originale.

Dans ce cadre, l'équipe du Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques de l'université de Bordeaux Ségalen de Yannick Crémillieux a étudié la biodistribution des nanoparticules AGuIX après une administration par voie orotrachéale (*o.t.*) ou intraveineuse (*i.v.*) sur des souris porteuse de glioblastomes.

Le glioblastome est le type de tumeur cérébrale le plus couramment rencontré chez l'adulte. Ce type de cancer est particulièrement agressif et la durée de vie médiane des patients diagnostiqués est de 15 mois. Les traitements actuellement proposés aux patients, (chimiothérapie et radiothérapie) ne permettent en général pas de détruire la tumeur et induisent de nombreux effets secondaires. De plus, ces tumeurs sont le plus souvent détectées relativement tard, compliquant encore plus les chances de rémission chez le patient.

L'accumulation des AGuIX, agent d'imagerie, au niveau des cellules cancéreuses permettrait un diagnostic plus précoce et plus précis du glioblastome. De plus, de par l'effet radiosensibilisant de ces Nps, leur accumulation spécifique dans les zones malades permettrait la réalisation d'un traitement de radiothérapie plus efficace grâce à un effet de dose local, tout en limitant au maximum les effets délétères sur les zones saines. La plupart des nanoparticules ont montré la propriété de s'accumuler spécifiquement et passivement dans les tumeurs grâce à l'effet EPR [3] (voir §1.3.2), toutefois, le mode d'administration des Nps peut-il encore améliorer cet effet de ciblage passif ?

Le mode d'administration le plus courant pour les agents thérapeutiques est l'injection intraveineuse. Une autre technique présente néanmoins de nombreux avantages : l'administration orotrachéale. En effet, cette technique est très efficace, sûre, très simple à mettre en œuvre et contrairement à l'injection intraveineuse, elle n'est pas invasive et ne nécessite pas l'utilisation d'aiguilles. L'équipe de Yannick Crémillieux a ainsi comparé l'influence de l'un ou l'autre mode

d'administration sur la biodistribution des Nps AGuIX dans les tumeurs, par le suivi *in vivo* en IRM des variations de contraste induit par les Nps.

Ils ont découvert que la pharmacocinétique dépendait fortement du mode d'administration. Après injection intraveineuse, la concentration en nanoparticules décroît exponentiellement dans les tumeurs avec une élimination rénale rapide. Dans le cadre d'une administration par voie orotrachéale, les nanoparticules sont dans un premier temps captées au niveau des poumons, puis diffusent dans le flux sanguin. Chez les souris saines, les nanoparticules s'accumulent directement au niveau des reins pour être éliminées. Dans le cas de souris porteuses de glioblastome, une partie des Nps est dans un premier temps captée au niveau de la tumeur par effet EPR (Figure 2-26.A).

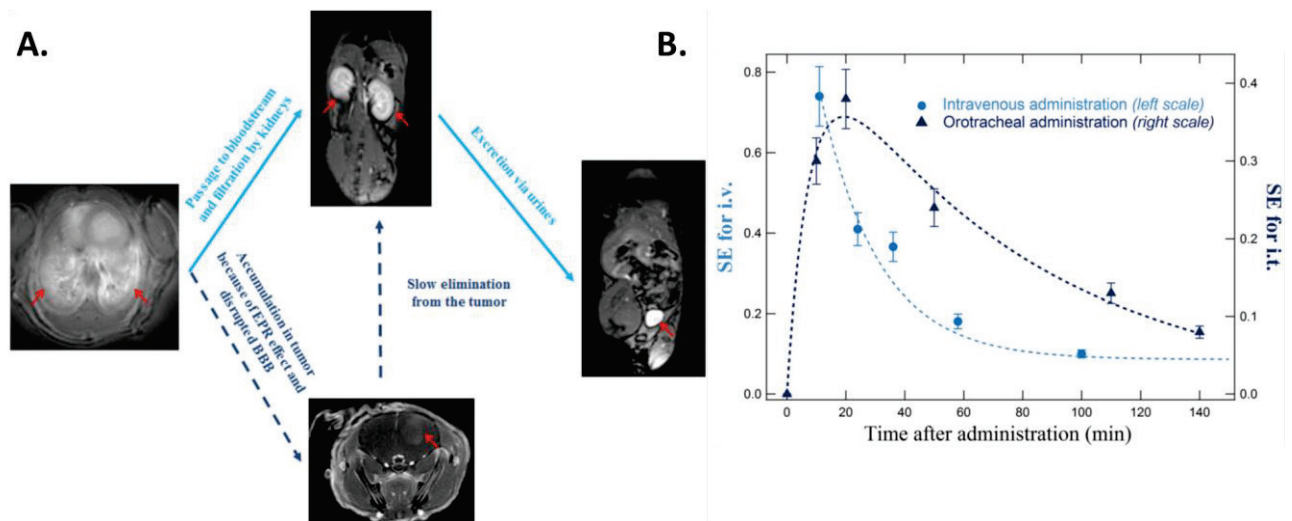
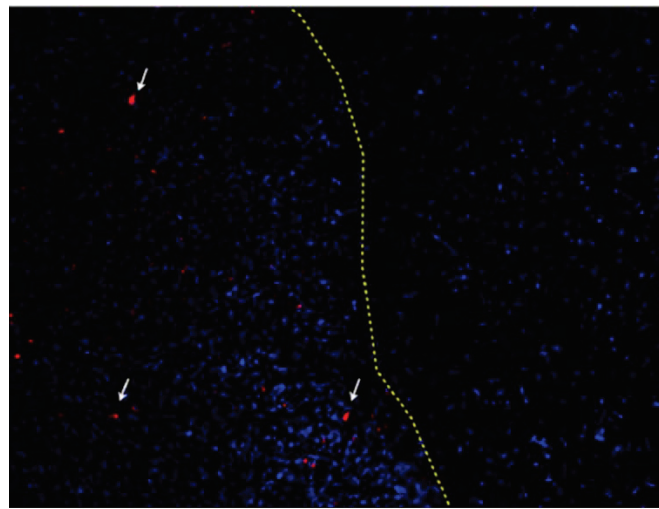


Figure 2-26 : A. représentation schématique des voies d'accumulation et d'élimination des nanoparticules AGuIX administrées par voie orotrachéale sur des souris saines ou porteuses de glioblastomes. B. Suivi du rehaussement du signal IRM dans les tumeurs en fonction du temps, après administration des Nps AGuIX par voie intraveineuse ou orotrachéale.

L'accumulation des AGuIX au niveau des tumeurs est fortement dépendante du mode d'administration. Après injection par intraveineuse, le maximum de rehaussement au niveau des tumeurs intervient juste après l'administration du produit (5-10 minutes). Il s'en suit une élimination très rapide où le rehaussement au niveau des tumeurs décroît de 50% au bout de 28 ± 10 min. D'un autre côté, le maximum de contraste n'est observé qu'au bout de 20-30 minutes après administration *o.t.* L'élimination des Nps au niveau des tumeurs est également beaucoup plus lente (+70% par rapport à l'administration *i.v.*) (Figure 2-26).

L'accumulation des Nps au niveau des tumeurs a été corroborée par des expériences d'histologie réalisées sur des coupes de cerveau de souris porteuse de glioblastomes, après injection orotrachéale de Nps AGuIX marquées à la Cyanine 5,5 (Figure 2-27). Les images de microscopie de fluorescence

confirment les conclusions faites à partir des données d'IRM : les Nps sont bien présentes spécifiquement au niveau des cellules malades et non au niveau des tissus sains.



Tissus tumoral

Tissus sain

Figure 2-27 : Microscopie de fluorescence ex vivo sur coupe de cerveau de souris porteuses de glioblastomes après administration des AGuIX@Cy5,5 par voie orotrachéale. Les flèches blanches indiquent la présence des nanoparticules.

En conclusion, la voie d'administration orotrachéale des Nps AGuIX permet leur accumulation par effet EPR au niveau des tumeurs, où les Nps sont retenues plus longtemps en comparaison à une administration *i.v.* . Cette stratégie peut ainsi permettre d'améliorer le diagnostic par IRM de tumeurs cérébrales, de manière non invasive.

2.4.4.2. PUBLICATION:

Research article



Received: 13 October 2014,

Revised: 17 February 2015,

Accepted: 7 March 2015,

Published online in Wiley Online Library: 29 April 2015

(wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/nbm.3295

Orotracheal administration of contrast agents: a new protocol for brain tumor targeting

Andrea Bianchi^{a†}, Damien Moncelet^{a†}, François Lux^b, Marie Plissonneau^{b,c}, Silvia Rizzitelli^a, Emeline Julie Ribot^a, Nawal Tassali^a, Véronique Bouchaud^a, Olivier Tillement^b, Pierre Voisin^a and Yannick Crémillieux^{a*}



The development of new non-invasive diagnostic and therapeutic approaches is of paramount importance in order to improve the outcome of patients with glioblastoma (GBM). In this work we investigated a completely non-invasive pre-clinical protocol to effectively target and detect brain tumors through the *oro-tracheal route*, using ultra-small nanoparticles (USRPs) and MRI.

A mouse model of GBM was developed. *In vivo* MRI acquisitions were performed before and after intravenous or oro-tracheal administration of the nanoparticles to identify and segment the tumor. The accumulation of the nanoparticles in neoplastic lesions was assessed *ex vivo* through fluorescence microscopy.

Before the administration of contrast agents, MR images allowed the identification of the presence of abnormal brain tissue in 73% of animals. After oro-tracheal or intravenous administration of USRPs, in *all* the mice an excellent colocalization of the position of the tumor with MRI and histology was observed. The elimination time of the USRPs from the tumor after the oro-tracheal administration was approximately 70% longer compared with intravenous injection.

MRI and USRPs were shown to be powerful imaging tools able to detect, quantify and longitudinally monitor the development of GBMs. The absence of ionizing radiation and high resolution of MRI, along with the complete non-invasiveness and good reproducibility of the proposed protocol, make this technique potentially translatable to humans. To our knowledge, this is the first time that the advantages of a *needle-free* oro-tracheal administration route have been demonstrated for the investigation of the pathomorphological changes due to GBMs. Copyright © 2015 John Wiley & Sons, Ltd.

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web site.

Keywords: glioblastoma; MRI; contrast agents; lungs; fluorescence imaging; oro-tracheal administration

INTRODUCTION

Glioblastoma (GBM) is the most common malignant primary brain tumor in adults. Despite conventional treatments, which typically include surgery, radiation, and cytotoxic chemotherapies, the median survival rate is only 14.6 months (1–3). These therapies show limits such as neurotoxicity, lack of specificity, and severe side effects. In addition, the blood–brain barrier (BBB) plays an important role in the GBM therapy. Indeed this barrier stops the accumulation of several drugs in the tumor, limiting the efficiency of the therapeutic compounds. Moreover, the poor prognosis of this pathology is also related to the late detection of GBM, which is often diagnosed in its latest stages (1–3). The development of new diagnostic and therapeutic approaches is therefore of paramount importance in order to improve the outcome of patients with GBM.

In this context, imaging techniques play a major role in early detection of diseases. They can provide early diagnostics and non-invasive longitudinal patient follow-ups, and help to prepare and guide radiotherapy or surgery. In particular, MRI displays a good resolution and excellent soft tissue contrast. Moreover, MRI is completely non-invasive for the patient because of the absence of ionizing radiation (4–7). For all these reasons, MRI is currently the gold standard for GBM diagnosis (8).

Development of contrast agents has been actively pursued to improve the potential of MRI in early detection of several pathologies (9,10). Nanoscale particles and carriers have already demonstrated effective applications in the diagnosis of diseases.

In addition, some of these nanocompounds, commonly known as theranostic agents, have also shown efficient results in the therapy of these pathologies (4,11). Nanoparticles have been reported to be efficacious in anti-angiogenesis therapy (12),

* Correspondence to: Yannick Crémillieux, Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques, CNRS UMR 5536, Université Bordeaux Segalen, Bordeaux, France.

E-mail: yannick.cremillieux@u-bordeaux.fr

a A. Bianchi, D. Moncelet, S. Rizzitelli, E. J. Ribot, N. Tassali, V. Bouchaud, P. Voisin, Y. Crémillieux
Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques, CNRS UMR 5536, Université Bordeaux Segalen, Bordeaux, France

b F. Lux, M. Plissonneau, O. Tillement
Institut Lumière Matière, CNRS UMR 5306, Université Claude Bernard, Domaine Scientifique de La Doua, Villeurbanne, France

c M. Plissonneau
Nano-H SAS, Saint-Quentin Fallavier, France

† These authors contributed equally.

Abbreviations used: GBM, glioblastoma; USRP, ultra-small rigid platform; BBB, blood–brain barrier; Cy, cyanine; i.t., intratracheal; i.v., intravenous; UTE, ultra-short echo time; ROI, region of interest; CNR, contrast-to-noise ratio; SNR, signal-to-noise ratio; PBS, phosphate buffered saline; SE, signal enhancement; PK, pharmacokinetics; EPR, enhanced permeability and retention; NSCLC, non-small-cell lung cancer.

immunotherapy (13), and gene therapy of GBM (14). Nanoparticles with radiosensitization properties have also been shown to be able to strongly improve the prognosis of GBM when used in conjunction with radiotherapy (15–17).

In order to deliver a high dose of radiation in the neoplastic site, while sparing healthy surrounding tissues, nanoparticles must show very good accumulation in the tumor for a sufficient time. On the other hand, nanoparticles must be cleared from the body in a reasonable time in order to avoid potential toxic effects. It is therefore straightforward that the administration modality plays a fundamental role in determining the efficiency of the nanoparticles, directly influencing the bioavailability of the injected substance and its elimination pathways. Among the possible administration routes, the possibility of delivering drugs to the body through the lungs has been rediscovered in the last decade, since it appears as an efficient, effective, non-invasive, reliable, and simple administration method (18–21), easily translatable to clinical practice (22).

In this work we describe for the first time a non-invasive pre-clinical protocol to effectively target and detect brain tumors through the orotracheal route, using small nanoparticles and MRI. These small nanoparticles, hereafter referred to as ultra-small rigid platforms (USRPs), were injected orotracheally into glioma-bearing mice. USRPs are sub-5 nm particles composed of gadolinium chelates covalently grafted to a polysiloxane matrix (17,23). A near-infrared fluorophore, cyanine (Cy) 5.5, was also grafted onto some of these nanoparticles (24). *In vivo* GBM signal enhancement (SE) and pharmacokinetics (PK) of orotracheal (intratracheal, i.t.) administration were measured against standard intravenous (i.v.) administration of the same number of USRPs.

EXPERIMENT

Nanoparticle synthesis and characterization

The Gd-DOTA-based nanoparticles were synthesized and characterized according to the previously described protocol (24,25). To perform *ex vivo* fluorescence microscopy, Cy 5.5, a near-infrared dye, was covalently grafted on the nanoparticles (24,25). Fluorescent USRPs are characterized by one Cy 5.5 grafted to every 1000 DOTA-Gd. Their longitudinal relaxivity r_1 is approximately $6 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ per gadolinium ion at 7 T (i.e. $60 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ per nanoparticle). Further details about the synthesis and the characterization can be found in the supporting information (with Figures S1–S3).

In vitro studies

Cell culture

Human GBM cell line U87-MG from the American Type Culture Collection (ATCC, LGC Standards, Middlesex, UK) was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, Fisher Scientific, Illkirch, France) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Gibco), in a humidified atmosphere with 5% CO_2 at 37 °C.

Flow cytometry and fluorescence microscopy

Uptake of USRPs by U87 cells was studied *in vitro* by flow cytometry and fluorescence microscopy.

For flow cytometry, 10^5 cells were seeded in 24 multiwell plates (Becton-Dickinson, Le Pont de Claix, France, $2 \text{ cm}^2/\text{well}$) for 24 h. Subsequently cells were incubated for 4 h with the fluorescent

USRPs ($[\text{Gd}^{3+}] = 5 \text{ mM}$). Then the medium was discarded and the cells were washed with Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI, Gibco). Thereafter cells were re-suspended in RPMI and analyzed by flow cytometry (Guava easyCyte flow cytometer-counter, Millipore, Billerica, MA, USA, λ_{ex} 638 nm, λ_{em} 661 nm).

For fluorescence microscopy, cells were seeded on glass coverslips for 24 h and incubated for 4 h with USRPs ($[\text{Gd}^{3+}] = 10 \text{ mM}$). After three washes, the coverslips were mounted on glass slides and observed using a Zeiss Axiovert 200 microscope (Jena, Germany).

In vivo studies

Animals

Five-week-old female NMRI nude mice ($n = 34$), weighing $21.0 \text{ g} \pm 0.4 \text{ g}$, were purchased from Elevage Janvier (Le Genest, Saint Isle, France). Before the beginning of the experiment, animals were acclimatized in a temperature-controlled environment for one week. Facility rooms were maintained at constant temperature (25 °C), humidity (40–50% relative humidity), and 12 h light-dark illumination cycle. Access to food and tap water was available *ad libitum*. Experiments were carried out following the INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale) guidelines regarding animal welfare with approval of the Comité d'Ethique en Expérimentation Animale de Bordeaux.

Tumor implantation

U87 cells were implanted in the brain of the nude immunodeficient mice ($n = 27$) as previously described (26). Animals were left in the temperature- and humidity-controlled environment described above for 8 days. Four mice did not undergo the orthotopic implantation and were left as controls. After 8 days, all the xenotransplanted animals developed a tumor and underwent MRI investigation for high-resolution detection of the brain tumor lesions.

Imaging protocol

MR images with a 7 T spectrometer were acquired starting from day 8 up to day 15. Between two different administrations of contrast agent on the same mouse, at least two days without any handling was planned in order to allow a complete elimination of the previously administered contrast agents (24,25,27). After the last imaging point animals were sacrificed for histological analysis or *ex vivo* fluorescence microscopy.

In detail, the first group, composed of four tumor-bearing mice and two controls, was imaged with MRI at day 8 before and after receiving an i.v. administration of $200 \mu\text{L}$ of USRPs ($[\text{Gd}^{3+}] = 50 \text{ mM}$). The same operation was repeated at day 15.

The second group, composed of six tumor-bearing mice and two controls, was imaged with MRI at day 8 after orotracheal administration of $50 \mu\text{L}$ of USRPs ($[\text{Gd}^{3+}] = 200 \text{ mM}$). On a subgroup of three animals, the same operation was repeated at day 10. On the other subgroup of three animals, the same operation was repeated at day 15. The orotracheal administration was performed as described in References 24 and 27.

The third group, composed of four tumor-bearing mice, was imaged with MRI at day 8 before and after receiving an i.v. administration of $200 \mu\text{L}$ of USRPs ($[\text{Gd}^{3+}] = 50 \text{ mM}$). This group of mice, in contrast to the first group, underwent MRI at day 10 before and after an *orotracheal* administration of $50 \mu\text{L}$ of USRPs ($[\text{Gd}^{3+}] = 200 \text{ mM}$).

The fourth group, composed of two tumor-bearing mice, was imaged with MRI at day 8 after orotracheal administration of a 50 μ L solution of NaCl 0.9% and at day 10 after i.v. administration of 200 μ L of NaCl 0.9%.

The fifth group, composed of three tumor-bearing mice, was imaged with MRI at day 8 before and after receiving an i.v. administration of 200 μ L of Dotarem® ([Gd³⁺] = 50 mM) (Guerbet, Villepinte, France).

The sixth group, of three tumor-bearing mice, was imaged with MRI at day 8 before and after receiving an orotracheal administration of 50 μ L of Dotarem® ([Gd³⁺] = 200 mM) (Guerbet).

MRI

The images were acquired with a 7 T BioSpec 70/20 spectrometer (Bruker, Ettlingen, Germany), using a transmitter/receiver quadrature coil of 25 mm inner diameter (Bruker). Mice were placed prone in a custom-built plastic holder and kept anesthetized with 2.5% isoflurane in a mixture of N₂/O₂ (80:20) via facial mask. The body temperature was kept constant using warm circulating water and the respiratory cycle was monitored constantly using a pressure sensor placed on the abdomen.

The images of the brain were acquired with a 2D ultra-short echo time (UTE) sequence (804 directions–256 points, two averages). For each animal 10 axial slices of the brain of 1 mm thickness were acquired with a TE of 368 μ s, FOV of 2 cm \times 2 cm, TR of 140 ms and FA of 60°, for a total acquisition time of about 4 min. The same sequence was used to image lungs, increasing the number of averages to four and the field of view to 3 cm \times 3 cm. Images were reconstructed with the ParaVision 5.1 software (Bruker). All the images were saved and analyzed with freeware medical image analysis software (MIPAV by NIH, Bethesda, MD, USA).

Image analysis

The presence and position of the tumor in MR images was assessed by two independent users for all the mice, according to a blinded procedure relative to animal implantation.

For each MR image, tumors were identified and regions of interest (ROIs) in the tumor and in the healthy brain tissues were manually segmented to measure the total average signal. The noise of the images was quantified as the standard deviation of the mean signal of an ROI selected in the image background and the signal-to-noise in the tumor was computed. The contrast-to-noise ratio (CNR) in each image was computed as the difference between the signal in the tumor and in the healthy tissue, normalized to the standard deviation of the image noise.

The PK of the USRPs contrast agent in the tumor region was studied according to the protocol already described in Reference 25.

Ex vivo studies

A subgroup ($n=4$) of tumor-bearing mice was imaged with *ex vivo* fluorescence imaging and histology at day 8 after orotracheal administration of 50 μ L of USRPs-Cy 5.5 ([Gd³⁺] = 200 mM). A subgroup ($n=4$) of tumor-bearing mice was imaged with *ex vivo* fluorescence imaging at day 8 after i.v. administration of 200 μ L of USRPs ([Gd³⁺] = 50 mM).

In detail, 30 min after the orotracheal or i.v. administration, mice were intracardially perfused with phosphate buffered saline (PBS) and fixed using paraformaldehyde (4%) in PBS. Brains were post-fixed for 24 h, and then cryoprotected using sucrose

gradients (10%, 20% and 30% in PBS). Brains were frozen using liquid nitrogen vapor and stored at -80°C .

Ex vivo fluorescence imaging

Thirty micrometer cryostat frontal sections were collected in cold cryoprotectant (50% PBS, 30% ethylene glycol and 20% glycerol) and stored at -20°C . Sections were washed four times in PBS and mounted on SuperFrost Plus slides with VECTASHIELD mounting medium containing DAPI (Vector Labs, Malvern, PA, USA). Slides were analyzed using a Leica (Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL, USA) DM5500 B microscope.

Histologic evaluation

Thirty micrometer cryosections were cut, dried at 45°C and fixed in 100% acetone for 10 min at room temperature. The sections were stained with hematoxylin and eosin using a standard protocol for histological assessment of cellular density and necrosis, and analyzed under a Leica DM5500 B microscope (2.5 \times and 10 \times magnification).

Statistical analysis

Comparison of CNR, SE, and tumor volumes between groups (i.v. USRPs, i.t. USRPs, i.v. Dotarem®) was performed using the Kruskal–Wallis test with Dunn's multiple comparison (non-parametric equivalent of the one-way ANOVA test). The paired non-parametric Wilcoxon test was used to evaluate the significance of changes in CNR, SE, and tumor volumes at two different time points. Significance was fixed at the 5% probability level. All analyses were performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). All the data are presented as mean value \pm standard error of the mean.

RESULTS

In vitro USRP uptake by U87 cells

The ability of U87 tumor cells to take up USRPs was characterized *in vitro*. Flow cytometry experiments demonstrated the USRP uptake by U87 cells (Supporting Information, Figure S4(a)). When cells were incubated with the nanoparticles, the mean fluorescent intensity increased from 10 to 70 A.U. Fluorescent microscopy suggested that USRPs may be internalized by U87 cells (Supporting Information, Figure S4(b)), as recently demonstrated in Reference (28).

Glioma detection and in vivo accumulation of USRPs

An orthotopic model of brain tumor morphologically similar to GBM was implemented in immunodeficient mice, inoculating U87 tumor cells intracranially into the striatum of the animals.

Before the administration of contrast agent, UTE MR images allowed the identification of the presence of abnormal brain tissue in a number of animals (~73%). Nonetheless, the contours of the carcinogenic formations were not easily identifiable (Fig. 1(a)).

After orotracheal or i.v. administration of USRPs, UTE MR images allowed the identification of the tumor in *all* the mice (Fig. 1(b), (c)). For all of them, a good co-localization of the position of the tumor between MRI and histology was observed. A representative image of the co-localization between MRI and histology is shown in the Supporting Information, Figure S5.

Comparison of SE and of CNR in the identified tumors after the administration of the contrast agent (Fig. 2) showed approximately halved values for the orotracheal (50 μ L at 200 mmol/L

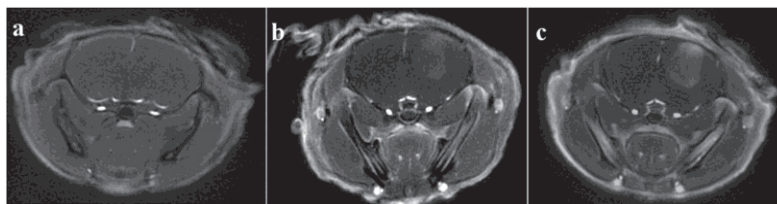


Figure 1. MR axial image of the brain (a) before and (b), (c) after the orotracheal (b) or i.v. (c) administration of the USRPs; (b) was acquired approximately 30 min after the orotracheal administration of 50 µL 200 mmol/L USRP [Gd³⁺] whereas (c) was acquired approximately 30 min after the i.v. administration of 200 µL 50 mmol/L USRP [Gd³⁺].

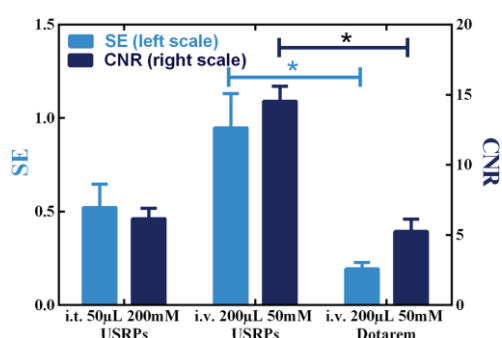


Figure 2. Bar plot showing the SE and CNR in tumors after the administration of the USRPs for the orotracheal (i.t., 50 µL at 200 mmol/L [Gd³⁺]) and the i.v. route (i.v., 200 µL at 50 mmol/L [Gd³⁺]), or after the i.v. administration of Dotarem® (i.v., 200 µL at 50 mmol/L [Gd³⁺]), using the same amount of Gd³⁺. Asterisks indicate significant differences ($p < 0.05$).

[Gd³⁺] administration with respect to the i.v. one (200 µL at 50 mmol/L [Gd³⁺]), using the same amount of Gd³⁺. The i.v. administration of a clinical commercially available contrast agent (Dotarem®) turned out to be approximately five times less effective than the same amount of intravenously administered USRPs (200 µL at 50 mmol/L [Gd³⁺]). This latter observation is related to the high rigidity of the USRPs compared with commercially available contrast agents (r_1 per gadolinium ion at 7 T ~ 6 mM⁻¹ s⁻¹ versus r_1 Dotarem® at 7 T ~ 3 mM⁻¹ s⁻¹) (29). Typically, an increase in the average signal-to-noise ratio (SNR) in brain tumor from 14.5 to 22.1, 28.3 and 17.3 was observed for the orotracheal administration of USRPs (50 µL at 200 mmol/L [Gd³⁺]), the i.v. administration of USRPs (200 µL at 50 mmol/L [Gd³⁺]), and the i.v. administration of Dotarem® (200 µL at 50 mmol/L [Gd³⁺]), respectively. Similarly, an average increase of the CNR between tumor and healthy tissues from 2.1 to 6.2, 14.5, and 5.2 was observed for the orotracheal administration of USRPs (50 µL at 200 mmol/L [Gd³⁺]), the i.v. administration of USRPs (200 µL at 50 mmol/L [Gd³⁺]), and the i.v. administration of Dotarem® (200 µL at 50 mmol/L [Gd³⁺]), respectively. No SE was observed after the orotracheal administration of Dotarem® (5.4 ± 6.2%).

The accumulation of the nanoparticles in the tumor region was assessed and confirmed by *ex vivo* fluorescence microscopy in a subgroup of animals, exploiting the multimodal potential of the USRPs. Cy 5.5 dye was covalently grafted onto the nanoassemblies and *ex vivo* microscopy was performed after the orotracheal or i.v. administration of the nanoparticles.

Regardless of the administration modality, brain sections showed the nanoparticles' accumulation inside the tumor and poorly in the vicinity of the tumor (Fig. 3).

No SE of lung parenchyma or brain tumor was observed in tumor-bearing mice after i.v. or orotracheal administration of saline solution. Animals that were not inoculated with U87 cells were used as controls. No SE was observed in their brain after i.v. or orotracheal administration of contrast agent. On the other hand, homogeneous enhancements of their lung parenchyma were observed after orotracheal instillation (see References 24 and 27)

Pharmacokinetics data

The observed PK after orotracheal administration of contrast agents in the lungs of *healthy* animals reproduced the results observed in Reference 24, with fast diffusion of the nanoparticles in the lungs and slow but uniform elimination from the parenchymal tissue. The nanoparticles eliminated from the lungs passed into the bloodstream and were filtered by the kidneys. In all the animals a significant renal clearance and negligible hepatic elimination were observed, after orotracheal or i.v. administration, as already reported in References 24, 25, and 27. This phenomenon is mostly related to the ultra-small size of the nanoparticles (hydrodynamic diameter < 5 nm) (23-25,27,30,31). No accumulation in the brain was detectable with MRI for both the administration modalities in *healthy* mice due to unaltered BBB.

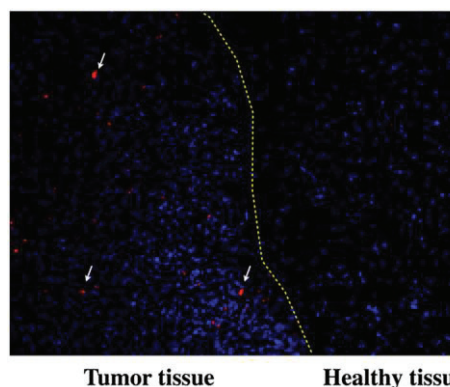


Figure 3. *Ex vivo* microscopy of a tumor section after i.t. administration of USRPs. White arrows indicate some fluorescent USRP-labeled cells inside the tumor.

In glioma-bearing mice, the PK observed in the tumor tissues after the i.v. administration of USRPs was rather different from that observed after orotracheal administration, as shown in Fig. 4. Following i.v. administration, the maximum SE of the tumor and CNR between tumor and healthy tissues were observed at the first acquired time point (5–10 min after injection). A rather fast elimination of the USRPs from the tumor tissue was then observed (50% drop of the SE observed in 28 ± 10 min).

On the other hand, the maximum of the SE was observed between 20 and 30 min after the orotracheal administration of USRPs. The elimination of the USRPs from the tumor after the orotracheal administration was approximately 70% longer compared with i.v. injection (50% drop of the SE observed in 46 ± 8 min). The CNR curve presented the same behavior as the SE one, indicating that the optimal time points for tumor detection and segmentation are between 20 and 30 min after the orotracheal administration.

Reproducibility of the protocol

A short-term reproducibility study for the orotracheal administration was performed. The subgroup of mice that received a second orotracheal administration of USRPs at 2 days interval showed no significant differences in tumor size ($p = 0.07$), SE ($p = 0.57$), or CNR ($p = 0.62$), confirming the reproducibility of the protocol (Supporting Information, Figure S6).

The possibility of studying the evolution of a tumor using the orotracheal administration protocol was evaluated. The subgroup of mice that received a second orotracheal administration of USRPs at 7 days interval showed a significant increase in the tumor volume quantified with MRI ($p < 0.01$). No significant increase in the SE ($p = 0.43$) or CNR ($p = 0.32$) was observed between the two time points (Supporting Information, Figure S7).

DISCUSSION

In the complex process of drug development, it is widely known that the administration route has a crucial role in the outcome of a given compound, since it affects, among other things, its bio-availability and its elimination (22,32). In the last two decades, strong interest has arisen around systemic delivery of therapeutic

drugs through inhalation, a delivery path that proved to be a fast, effective, and above all non-invasive way to bring macromolecules or small molecules into the blood circulation before reaching the desired target (18,22). The most striking example of the clinical potential of this administration route can be found in the multiplication of the number of inhaled insulin formulations approved (in Europe and the USA) for the treatment of diabetic patients. It is worth mentioning that these inhaled drugs have been shown to be as reliable and safe as injected insulin (22,33–36).

Building on these promising developments and clinical applications, in this work we have decided to investigate the feasibility of using orotracheally delivered contrast agents in order to visualize and delineate GBM in a validated mouse model (26). To do so, previously studied gadolinium-based nanoparticles with high relaxivity and ultra-small size have been selected for the investigation (17,23–25,27). Orotracheal administration of USRPs was compared with a standard i.v. administration of the same contrast agent with respect to tumor SE, CNR, and PK.

Both the administration modalities allowed the visualization and delineation of the brain tumor volume, as confirmed by histological analysis. For both the routes, indeed, the tumor borders were easily identifiable after the administration of the same quantity of Gd^{3+} . The accumulation of the nanoparticles in the tumor tissues was confirmed by *ex vivo* fluorescence microscopy. It is important to mention here that, on average, only one nanoparticle in 100 presents a grafted fluorophore, implying that the fluorescence visible in the tumor region represents only a small percentage of the total significant accumulation (Fig. 3). No significant fluorescent USRPs were found in the healthy tissues surrounding the tumor. These findings are of crucial importance since, for the first time, they show that the orotracheal route is a viable non-invasive path to reach brain tumors, opening the way to a new fully non-invasive diagnostic approach to GBM.

The SNR and CNR values measured after i.v. administration were higher compared with those obtained for i.t. administration. This result is not surprising, considering that the orotracheal administration requires a further step compared with the i.v. route, i.e. the passage of the nanoparticles from the lungs to the blood system. These nanocompounds have indeed already been shown to be able to escape the lung mononuclear phagocytic system and pass rapidly from the airways to the bloodstream, before being finally filtered by the kidneys (24,25,27). This behavior is strongly related to the ultra-small hydrodynamic diameter of the nanoparticles and can be obtained with virtually any contrast agent having a diameter inferior to 6 nm. For higher hydrodynamic sizes, however, a variation of the trafficking of the particles across the alveolar surface into tissue and blood may be different (30) and the orotracheal route may no longer be effective for reaching brain tumors. Once in the blood, for both the i.t. and i.v. administrations, the contrast agents tend to accumulate in the brain tumor because of the BBB disruption and the consequent enabling of the well-known enhanced permeability and retention (EPR) effect (37,38). The USRPs are subsequently filtered by the kidney and excreted in the urine, without significant hepatic clearance.

This pharmacokinetic behavior of orotracheally administered nanoparticles should in principle also be valid for compounds such as Dotarem®. The fact that no SE of brain tumor was observed after orotracheal administration of Dotarem® is seemingly due to the lower relaxivity of this compound compared with the USRPs, as already observed in the fivefold lower SE measured

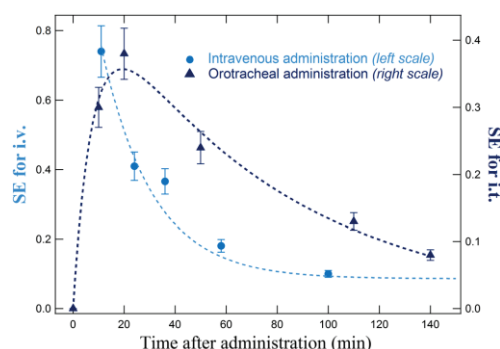


Figure 4. Plot showing the SE of the tumor as a function of time after i.v. or orotracheal administration. Dashed lines indicate the approximate PK behavior observed with the two administration routes (indicative fit of the data, not used for quantification).

A NEW PROTOCOL TO TARGET BRAIN CANCER

after i.v. administration of Dotarem®. In addition, a previous study has shown that Dotarem® has a brain tumor residence time about half that of the USRPs (39). As a consequence, the contrast is probably eliminated from the tumor before reaching a relevant concentration able to generate a visible enhancement of the GBM.

An increase in the concentration of the orotracheally administered Dotarem® would most probably result in a significant accumulation of the contrast agent in brain tissue, as observed for the USRPs.

The PKs observed after the two different administration modalities are different and reflect the distinct nanoparticle paths described above. For i.v. administrations, the maximum of the SE can be observed a few minutes after the administration of the contrast agent, due to the direct accumulation of the nanoparticles in the GBM because of passive targeting mechanisms. Nanoparticles are then quite rapidly cleared from the GBM and from the systemic circulation. This kind of PK presents the clear advantage of enabling a fast imaging protocol, which may be reflected in an effective patient management workflow in clinical practice. This administration route is the standard one for diagnostic applications nowadays.

In contrast, after orotracheal administration, a roughly homogeneous SE can be observed in the lung parenchyma. A slow but effective elimination of the contrast agent is then observed in the healthy lung tissue, with an elimination time constant of

roughly two hours and a half. Once in the bloodstream, the nanoparticles are eliminated through the kidneys. If a brain tumor is present, the nanoparticle will accumulate in the neoplastic lesions because of the EPR effect, as schematically shown in Fig. 5. This protocol presents the inconvenient related to the fact that the maximum SE in the GBM is slightly delayed compared with i.v., potentially increasing (even though not dramatically) the time required for an examination in clinical practice. On the other hand, the protocol is non-invasive and does not require the use of needles.

The long residence time of the USRPs in the tumor permit us to envisage several imaging and therapeutic protocols. Ultra-small gadolinium-based nanoparticles, similar to the ones presented in this work, have been shown to have a potential theranostic application in brain tumors due to the radiosensitizing effect of the Gd atoms (15). The long retention of the USRPs in the tumor and the accurate knowledge of the PK of the contrast agent in the healthy and diseased tissues would allow tailoring of the radiation therapy according to the accumulation effect measurable with MRI. As a consequence, this would optimize the theranostic efficacy of these nanoassemblies, reducing the radiation dose to healthy tissues. It is worth mentioning here that the retention of these nanoparticles might be even more effective when exploiting active targeting ligands such as cRGD, which has already been satisfactorily grafted on similar nanoparticles in a different study (40). Such a hypothesis is currently under investigation. Finally, considering

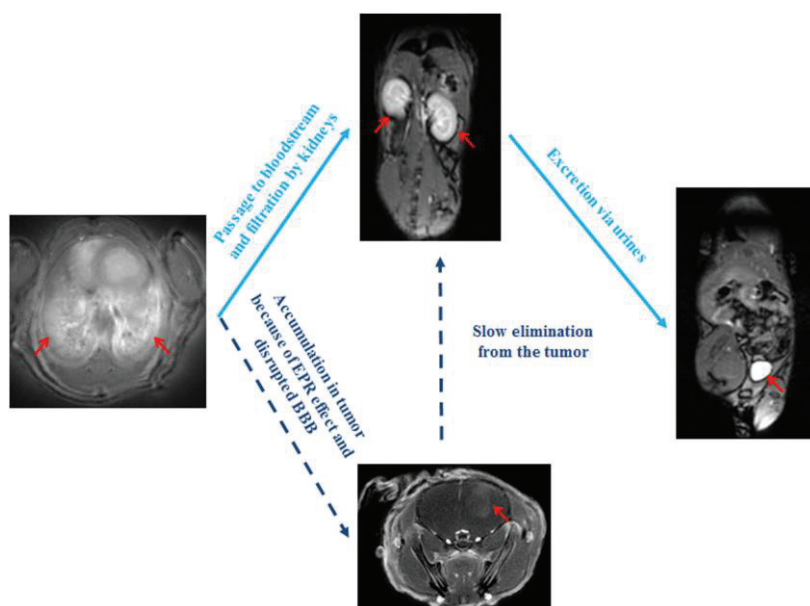


Figure 5. Schematic representation of accumulation and elimination pathways of orotracheally administered USRPs in healthy and glioma-bearing mice. The nanoparticles, administered directly to the lungs, enhance the signal of the pulmonary parenchyma in a homogeneous way. The contrast agents slowly pass to the bloodstream. Once there, two different pathways are possible: (i) in healthy mice, the USRPs are directly filtered by the kidneys and eliminated through the bladder without significant hepatic clearance (pathway schematically shown by solid lines); (ii) in glioma-bearing mice, some of the nanoparticles are directly filtered by the kidneys (as for healthy mice) while some of them tend to accumulate in the brain tumor because of the EPR effect. A slow elimination of the nanoparticles from the tumor site is subsequently observed, leading to the eventual elimination of the USRPs in the urine, without significant accumulation in the liver (pathway schematically shown by dashed lines). Arrows indicate the presence of the contrast agent in the lungs, kidneys, bladder, and brain tumor.

the long retention and rather specific accumulation of the nanoparticles in the neoplastic lesions, the possibility of using the USRPs as anti-cancer drug carriers is a concrete possibility that may be further explored in the future.

The orotracheal administration of contrast agents used in this animal study can be translated to humans with simple aerosols. Haage *et al.* (41) have indeed already shown that aerosolized gadolinium contrast agents can be safely administered to humans for lung applications. Leaving aside the possible implementation of theranostic treatments, it is important to mention that the protocol developed here does not require the use of needles, in contrast to i.v. administrations. This original non-invasive approach for diagnostics may have straightforward applications and advantages in clinical practice, considering that at least 10% of the population is affected by the pathological condition of needle phobia (42). This percentage most likely underestimates the real burden, since most of the patients suffering from this fear tend to avoid all medical treatments. Even for people not suffering from this real phobia, it is clear that a diagnostic protocol that uses aerosols instead of injections would be less traumatic for the patient and would most probably reduce the typical pre-examination stress. Nevertheless, it is important to underline here that this study is a proof of concept and thus further investigations will be needed to validate the inhalation route as a viable, safe and useful way of administering contrast agents to non-invasively diagnose GBMs in patients.

When measured only two days after orotracheal administration of USRPs, the brain tumors were statistically identical (SE, CNR, volume), confirming the reproducibility of the non-invasive measurements made with the proposed method. In addition, as expected, when measured at a one week interval, the non-treated carcinogenic formations increased in size and in tumor cell density. No increase in CNR or SE was observed, probably due to the fact that tumors take up roughly the same number of nanoparticles at the two different stages, as already observed for non-small-cell lung cancers (NSCLCs) (25).

T_2 -weighted and T_1 -weighted spin-echo sequences are usually employed for contrast-enhanced MRI visualization of mouse glioma (43) since these sequences provide high tumor tissue contrast in both pre- and post-contrast agent administration. In this work, the localization and delineation of brain tumors using both the orotracheal and the i.v. delivery of contrast agents was performed using an optimized UTE MRI sequence employing radial k -space sampling. The rationale behind this choice was twofold. First, the employed sequence is strongly T_1 weighted (27,44) with negligible T_2 weighting, thus allowing more accurate visualization of the contrast agent accumulation, distribution, and evolution. Second, the UTE sequence used in this study had been previously optimized to visualize lung parenchyma and pulmonary signal changes (24,25,27,45). These sequences are indeed less sensitive to cardio-respiratory motion than Cartesian MR acquisitions (45–48). As a consequence, free-breathing acquisitions can be performed with limited impact on lung image SNR, sharpness, and spatial resolution when the visualization of lung is of interest (45–48). In other words, the use of UTE sequences allowed at the same time the proper visualization of brain tumor SEs due to contrast agents and the visualization of the nanoparticles in the lungs when administered orotracheally.

In addition, the same MRI protocol with orotracheally administered nanoparticles as employed in this work has already been shown to be extremely efficient for the detection (25) and therapy (49) of NSCLCs. Knowing that the development of brain

cancer metastasis may start from primary NSCLCs (50–52), the UTE protocol described in this work (in conjunction with contrast agents) may be employed for the simultaneous diagnosis and follow-up of both the organs.

In general, it is clear that the results presented in this work are fairly independent of the particular choice of the sequence, as long as the employed MRI pulse sequence is sensitive enough to detect changes in NMR brain signal related to the accumulation of a positive contrast agent. Nonetheless, even better results (higher SEs) may be achieved using spin-echo sequences.

In conclusion, the observed high reproducibility and efficacy of the protocol, altogether, make the orotracheal administration of Gd-based nanoparticles a good candidate for early brain cancer detection and non-invasive follow-up of this disease. In addition, the previously demonstrated negligible acute toxicity of the USRPs and favorable PK (24), their theranostic properties (15), and the possibility of replacing the orotracheal administration with a simpler aerosol, altogether, make the proposed protocol potentially translatable to human studies. To our knowledge, this is the first time that a study has clearly shown that the synergic employment of a T_1 -weighted MRI UTE sequence and orotracheally administered gadolinium-based nanoparticles allow the detection of millimetric-size brain tumors and of their contours. This study has indeed shown that the orotracheal route is a viable pathway of strong interest to reach the brain, opening the way to the implementation of effective non-invasive and non-traumatic (needle-free) diagnostic protocols of brain tumor. Potential applications of this result may range from brain neoplastic pathology detection to therapeutic applications of selected drugs or lead compounds, grafted onto the contrast agent and non-invasively delivered to the tumor site through inhalation.

Conflict of Interest

The authors have no conflict of interest to declare.

Acknowledgements

A.B. acknowledges a fellowship from the European Network PINET (FP7-PEOPLE-2010-ITN-264864). The authors acknowledge the support of the Agence Nationale de la Recherche (ANR-12-P2N-0009) for the ANR project GD-LUNG. The authors acknowledge Mr Stephane Sanchez for help with the animals, Mr Gerard Raffard for help with the MRI, and Dr J. P. Konsman for help with histology.

REFERENCES

1. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO, for the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups and the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 2005; 352: 987–996.
2. Curran WJ, Jr, Scott CB, Horton J, Nelson JS, Weinstein AS, Fischbach AJ, Chang CH, Rotman M, Asbell SO, Krisch RE, Nelson DF. Recursive partitioning analysis of prognostic factors in three Radiation Therapy Oncology Group malignant glioma trials. *J. Natl. Cancer Inst.* 1993; 85: 704–710.
3. De Angelis LM. Brain tumors. *N. Engl. J. Med.* 2001; 344: 114–123.
4. Van Echteld CJA, Beckmann N. A view on imaging in drug research and development for respiratory diseases. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2011; 337: 335–349.

5. Bernstein MA, King KF, Zhou XJ. *Handbook of MRI Pulse Sequences*. Elsevier: Burlington, VT; 2004.
6. Weissleder R, Pittet MJ. Imaging in the era of molecular oncology. *Nature* 2008; 452: 580–589.
7. Edelman RR, Hesselink JR, Zlatkin MB, Cruess JV, III. *Clinical Magnetic Resonance Imaging*. Saunders-Elsevier: Philadelphia, PA; 2005.
8. Dhermain FG, Hau P, Lanfermann H, Jacobs AH, van den Bent MJ. Advanced MRI and PET imaging for assessment of treatment response in patients with gliomas. *Lancet Neurol*. 2010; 9: 906–920.
9. V. M. Runge. *Clinical MRI*. Saunders: Philadelphia, PA; 2002.
10. Merbach AE, Toth E. *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*. Wiley: New York; 2001.
11. Ferrari M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat. Rev. Cancer* 2005; 5: 161–171.
12. Wojton J, Chu Z, Mathsyaraja H, Meisen WH, Denton N, Kwon CH, Chow LM, Palascak M, Franco R, Bourdeau T, Thornton S, Ostrowski MC, Kaur B, Qi X. Systemic delivery of SapC-DOPS has antiangiogenic and antitumor effects against glioblastoma. *Mol. Ther.* 2013; 21: 1517–1525.
13. Zhao D, Alizadeh D, Zhang L, Liu W, Farrukh O, Manuel E, Diamond DJ, Badie B. Carbon nanotubes enhance CpG uptake and potentiate antitumor immunity. *Clin. Cancer Res.* 2011; 17: 771–782.
14. Kato T, Natsume A, Toda H, Iwamizu H, Sugita T, Hachisu R, Watanabe R, Yuki K, Motomura K, Bankiewicz K, Wakabayashi T. Efficient delivery of liposome-mediated MGMT-siRNA reinforces the cytotoxicity of temozolomide in GBM-initiating cells. *Gene Ther.* 2010; 17: 1363–1371.
15. Le Duc G, Miladi I, Alric C, Mowat P, Bräuer-Krisch E, Bouchet A, Khalil E, Billotey C, Janier M, Lux F, Epicier T, Perriat P, Roux S, Tillement O. Toward an image-guided microbeam radiation therapy using gadolinium-based nanoparticles. *ACS Nano* 2011; 5: 9566–9574.
16. Joh DY, Sun L, Stangl M, Al Zaki A, Murty S, Santoemma PP, Davis JJ, Baumann BC, Alonso-Basanta M, Bhang D, Kao GD, Tsourkas A, Dorsey JF. Selective targeting of brain tumors with gold nanoparticle-induced radiosensitization. *PLoS One* 2013; 8: e62425.
17. Mignot A, Truillet C, Lux F, Sancey L, Louis C, Denat F, Boschetti F, Bocher L, Gloter A, Stéphane O, Antoine R, Dugourd P, Luneau D, Novitchi G, Figueiredo LC, de Moraes PC, Bonneviot L, Albela B, Ribot F, Van Lokeren L, Déchamps-Olivier I, Chuburu F, Lemerrier C, Villiers C, Marche PN, Le Duc G, Roux S, Tillement O, Perriat P. A top-down synthesis route to ultrasmall multifunctional Gd-based nanoparticles for theranostic applications. *Chem. Eur. J.* 2013; 19: 6122–6136.
18. Patton JS, Fishburn CS, Weers JG. The lungs as a portal of entry for systemic drug delivery. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2004; 1: 338–344.
19. Driscoll KE, Costa DL, Hatch G, Henderson R, Oberdorster G, Salem H, Schlesinger RB. Intratracheal instillation as an exposure technique for the evaluation of respiratory tract toxicity: uses and limitations. *Toxicol. Sci.* 2000; 55: 24–35.
20. Costa DL, Lehmann JR, Winsett D, Richards J, Ledbetter AD, Dreher KL. Comparative pulmonary toxicological assessment of oil combustion particles following inhalation or instillation exposure. *Toxicol. Sci.* 2006; 91: 237–246.
21. Shoyele SA, Cawthome S. Particle engineering techniques for inhaled biopharmaceuticals. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 2006; 58: 1009–1029.
22. Patton JS, Byron PR. Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2007; 6: 67–74.
23. Lux F, Mignot A, Mowat P, Louis C, Dufort S, Bernhard C, Denat F, Boschetti F, Brunet C, Antoine R, Dugourd P, Laurent S, Vander Elst L, Müller R, Sancey L, Jossierand V, Coll JL, Stupar V, Barbier E, Rémy C, Broisat A, Ghezzi C, Le Duc G, Roux S, Perriat P, Tillement O. Ultrasmall rigid particles as multimodal probes for medical applications. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2011; 123: 12507–12511.
24. Bianchi B, Dufort S, Lux F, Courtois A, Tillement O, Coll JL, Crémillieux Y. Quantitative biodistribution and pharmacokinetics of theranostic multimodal gadolinium-based nanoparticles for lungs using ultra-short TE MRI. *Magn. Reson. Mater. Phys.* 2014; 27: 303–316.
25. Bianchi A, Dufort S, Lux F, Fortin PY, Tassali N, Tillement O, Coll JL, Crémillieux Y. Targeting and in vivo imaging of non-small-cell lung cancer using nebulized multimodal contrast agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014; 111: 9247–9252.
26. Ribot EJ, Miraux S, Kongsman JP, Bouchaud V, Pourtau L, Delville MH, Franconi JM, Thiaudière E, Voisin PJ. In vivo MR tracking of therapeutic microglia to a human glioma model. *NMR Biomed.* 2011; 24: 1361–1368.
27. Bianchi A, Lux F, Tillement O, Crémillieux Y. Contrast enhanced lung MRI in mice using ultra-short echo time radial imaging and intratracheally administered Gd-DOTA-based nanoparticles. *Magn. Reson. Med.* 2013; 70: 1419–1426.
28. Stefančíková L, Porcel E, Eustache P, Li S, Salado D, Marco S, Guerquin-Kern JL, Réfrégiers M, Tillement O, Lux F, Lacombe S. Cell localization of gadolinium-based nanoparticles and related radiosensitising efficacy in glioblastoma cells. *Cancer Nanotechnol.* 2014; 5: 6.
29. Laurent S, Elst LV, Müller RN. Comparative study of the physicochemical properties of six clinical low molecular weight gadolinium contrast agents. *Contrast Media Mol. Imaging* 2006; 1: 128–137.
30. Choi HS, Ashtate Y, Lee JH, Kim SH, Matsui A, Insin N, Bawendi MG, Semmler-Behnke M, Frangioni JV, Tsuda A. Rapid translocation of nanoparticles from the lung airspaces to the body. *Nat. Biotechnol.* 2010; 28: 1300–1303.
31. Choi HS, Liu W, Liu F, Nasr K, Misra P, Bawendi MG, Frangioni JV. Design considerations for tumour-targeted nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* 2010; 5: 42–47.
32. Roa WH, Azarmi S, Al-Hallak MK, Finlay WH, Magliocco AM, Löbenberg R. Inhalable nanoparticles, a non-invasive approach to treat lung cancer in a mouse model. *J. Control. Release* 2011; 150: 49–55.
33. Patton JS, Bukar JG, Eldon MA. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled insulin. *Clin. Pharmacokinet.* 2004; 43: 781–801.
34. Quattrin T, Belanger A, Bohannon NJV, Schwartz SL. Efficacy and safety of inhaled insulin (Exubera) compared with subcutaneous insulin therapy in patients with type 1 diabetes: results of a 6-month, randomized, comparative trial. *Diabetes Care* 2004; 27: 2622–2627.
35. Hollander PA, Blonde L, Rowe R, Mehta AE, Milburn JL, Hershon KS, Chiasson JL, Levin SR. Efficacy and safety of inhaled insulin (Exubera) compared with subcutaneous insulin therapy in patients with type 2 diabetes: results of a 6-month, randomized, comparative trial. *Diabetes Care* 2004; 27: 2356–2362.
36. DeFronzo RA, Bergenstal RM, Cefalu WT, Pullman J, Lerman S, Bode BW, Phillips LS, Exubera Phase III. Study Group. Efficacy of inhaled insulin in patients with type 2 diabetes not controlled with diet and exercise: a 12-week, randomized, comparative trial. *Diabetes Care* 2005; 28: 1922–1928.
37. Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J. Control. Release* 2000; 65: 271–284.
38. Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* 1986; 46: 6387–6392.
39. Le Duc G, Roux S, Tuarez AP, Dufort S, Brauer E, Marais A, Truillet C, Sancey L, Perriat P, Lux F, Tillement O. Advantages of gadolinium based ultrasmall nanoparticles vs molecular gadolinium chelates for radiotherapy guided by MRI for glioma treatment. *Cancer Nanotechnol.* 2014; 5: 4.
40. Morlieras J, Dufort S, Sancey L, Truillet C, Mignot A, Rossetti F, Dentamaro M, Laurent S, Vander Elst L, Müller RN, Antoine R, Dugourd P, Roux S, Perriat P, Lux F, Coll JL, Tillement O. Functionalization of small rigid platforms with cyclic RGD peptides for targeting tumors overexpressing $\alpha v \beta 3$ -integrins. *Bioconjugate Chem.* 2013; 24: 1584–1597.
41. Haage P, Karaagac S, Spüntrup E, Truong HT, Schmidt T, Günther RW. Feasibility of pulmonary ventilation visualization with aerosolized magnetic resonance contrast media. *Invest. Radiol.* 2005; 40: 85–88.
42. Hamilton JG. Needle phobia: a neglected diagnosis. *J. Fam. Pract.* 1995; 41: 169–175.
43. Cha S, Johnson G, Wadghiri YZ, Jin O, Babb J, Zagzag D, Turnbull DH. Dynamic, contrast-enhanced perfusion MRI in mouse gliomas: correlation with histopathology. *Magn. Reson. Med.* 2003; 49: 848–855.
44. Crémillieux Y, Briguët A, Deguin A. Projection-reconstruction methods: fast imaging sequences and data processing. *Magn. Reson. Med.* 1994; 32: 23–32.
45. Bianchi A, Ozier A, Ousova O, Raffard G, Crémillieux Y. Ultrashort-TE MRI longitudinal study and characterization of a chronic model of asthma in mice: inflammation and bronchial remodeling assessment. *NMR Biomed.* 2013; 26: 1451–1459.
46. Zurek M, Bessaad A, Cieslar K, Crémillieux Y. Validation of simple and robust protocols for high-resolution lung proton MRI in mice. *Magn. Reson. Med.* 2010; 64: 401–407.

47. Bergin CJ, Pauly JM, Macovski A. Lung parenchyma: projection reconstruction MR imaging. *Radiology* 1991; 179: 777–781.
48. Bianchi A, Dufort S, Fortin PY, Lux F, Raffard G, Tassali N, Tillement O, Coll JL, Crémillieux Y. *In vivo* MRI for effective non-invasive detection and follow-up of an orthotopic mouse model of lung cancer. *NMR Biomed.* 2014; 27: 971–979.
49. Dufort S, Bianchi A, Henry M, Lux F, Le Duc G, Josserand V, Louis C, Perriat P, Crémillieux Y, Tillement O, Coll JL. Nebulized gadolinium-based nanoparticles: a theranostic approach for lung tumor imaging and radiosensitization. *Small* 2015; 11: 215–221.
50. Mintz A, Perry J, Spithoff K, Chambers A, Laperriere N. Management of single brain metastasis: a practice guideline. *Curr. Oncol.* 2007; 14: 131–143.
51. Eichler AF, Loeffler JS. Multidisciplinary management of brain metastases. *Oncologist* 2007; 12: 884–898.
52. Langer CJ, Mehta MP. Current management of brain metastases, with a focus on systemic options. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 6207–6219.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web site.

CHAPITRE 3 : CIBLAGE DE FIBRES AMYLOÏDES

3. CIBLAGE ACTIF DE FIBRES AMYLOÏDES

Ce chapitre traite du ciblage actif de fibres amyloïdes *via* différentes stratégies de vectorisation des nanoparticules AGuIX. Ce projet, dénommé Dia-Amyl, est réalisé dans le cadre d'un financement européen EuroNanomed et regroupe différents collaborateurs,

- (i) L'équipe « Amyloid Fibres: From Foldopathies to NanoDesign » (AFFOND) du CEA de Grenoble, avec Vincent Forge, Christel Marquette, Pierre Mowat (postdoctorant) et Jonathan Pansieri (doctorant); responsables de la croissance des fibres amyloïdes et des tests biochimiques.
- (ii) L'équipe d'Eric Alléman de l'université de pharmacie Genève, qui, avec Nathalie Stansky-Heilkron (doctorante), sont responsables d'une partie des tests Biacore ainsi que des tests *in vivo*.
- (iii) Mireille Dumoulin, du centre de l'ingénierie des Protéines de l'Université de Liège, est spécialiste de la production et de la caractérisation des nanobodies.
- (iv) L'entreprise d'accueil de ma thèse (financement CIFRE) : Nano-H S.A.S, responsable de la production des nanoparticules.
- (v) l'Institut Lumière Matière (ILM), laboratoire d'accueil où se déroule mon doctorat.
- (vi) L'équipe I2B de Richard Cohen de l'institut MATEIS où j'ai pu réaliser le développement d'une méthode Biacore pour l'évaluation de l'affinité des nanoparticules vectorisées vis-à-vis des fibres amyloïdes en partenariat avec Laurence Heinrich Balard (MCF) et Pascaline Rivory (Ingénieure d'étude).

Le but de ce projet est de tester l'affinité des nanoparticules AGuIX, vectorisées par différentes stratégies, pour trois types de pathologies amyloïdes. L'objectif final est de proposer un agent d'imagerie et de thérapie pour un diagnostic précoce du développement des amyloïdoses.

3.1. L'AMYLOÏDOSE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

3.1.1. LA MALADIE D'ALZHEIMER

La maladie d'Alzheimer est une pathologie neurodégénérative liée au vieillissement. Le premier symptôme est une perte de la mémoire immédiate, suivi de troubles cognitifs plus importants tels que la confusion, la perte de repères spatiaux temporels et des troubles de l'humeur. Dans les stades avancés de la maladie, les neurones peuvent être suffisamment endommagés pour provoquer une perte des fonctions autonomes puis la mort.

Aujourd'hui, on recense dans le monde un nouveau patient atteint de la maladie d'Alzheimer toutes les 7 secondes. Avec le vieillissement généralisé de la population mondiale, le nombre de personnes atteintes par Alzheimer est en constante augmentation. En 2040, il est estimé que 2 millions de personnes en France et 80 millions de personnes dans le monde souffriront de cette pathologie. Actuellement, le diagnostic de la maladie d'Alzheimer ne se réalise qu'indirectement grâce à une batterie de tests cognitifs, ou directement par biopsie *post mortem* [100]. Les seuls traitements proposés au patient sont symptomatiques et n'ont pas d'effet sur le développement de la maladie. Enfin, la prise en charge des patients atteints par cette pathologie est particulièrement éprouvante pour leurs proches et coûteuse pour la société [101], [102]. Face à cette situation, il apparaît primordial de développer des outils permettant de diagnostiquer la maladie d'Alzheimer à des stades précoces de son développement et de proposer des traitements permettant de guérir cette pathologie ou à *minima* de limiter son développement.

Au cours des dernières années, d'intenses recherches ont été effectuées dans ce sens. Il a ainsi été prouvé que le développement de la maladie d'Alzheimer était lié i) aux agrégats de protéines tau qui induisent une dégénérescence neurofibrillaire à l'intérieur des neurones [103] ; ii) aux dépôts de fibres amyloïdes dans le milieu extracellulaire [104].

Au cours de ce travail de thèse je me suis intéressée au ciblage des fibres amyloïdes, qui peuvent être également impliquées dans le développement d'autres pathologies et ne détaillerai donc pas les mécanismes induits par la protéine Tau. Ainsi, la partie suivante traite de la formation des fibres amyloïdes ainsi que leurs effets sur l'organisme à partir de l'exemple de la maladie d'Alzheimer.

3.1.2. LES PATHOLOGIES AMYLOÏDES

3.1.2.1. ORIGINES

Les fibres amyloïdes sont composées d'assemblages de protéines qui se déposent en agrégats insolubles et hautement organisés dans l'organisme. En 2014, plus de 20 protéines ou peptides sont identifiés comme amyloïdogéniques [105]. Selon la protéine à l'origine de la formation des plaques et sa zone de déposition, ce phénomène biologique peut conduire à des pathologies telles que la maladie de Parkinson, le diabète de type II, des formes de cardiomyopathies, ou, comme cité précédemment, la maladie d'Alzheimer (Tableau 3-1)[106].

Tableau 3-1: Exemple de protéines amyloïdogéniques et leurs précurseurs. Adapté de [105]–[107]

Polypeptide précurseur	Protéine Amyloïdogénique	Distribution	Syndrome associé ou Tissus atteints
Précurseur de la protéine Aβ	A β	Localisée	Maladie d'Alzheimer
Amyline	IAPP	Localisée	Diabète de type II
Transthyrétine	TTR	Systémique	Polyneuropathie Cardiomyopathie
Apolipoprotéine	ApoAI	Systémique	Foie, rein, cœur
Protéine Prion	PrP	Localisé	Maladie de Creutzfeldt-Jakob Insomnie fatale
Chaîne légère de l'immunoglobine	IgG-LC	Systémique et/ou Localisé	Amyloïdose primaire associée au myélome
α-Synucléine	α -Syn	Localisée	Maladie de Parkinson

A ce jour, il est établi que la séquence d'acides aminés d'une protéine n'a pas d'influence sur son évolution en fibres amyloïdes [108]. La cause de l'apparition d'une pathologie amyloïde n'est pas encore parfaitement élucidée. Dans de nombreux cas, celle-ci est liée à l'âge (maladie d'Alzheimer), mais peut également être issue d'une mutation génétique héréditaire (AApoAI) ou de facteurs environnementaux comme une contamination aux métaux lourds ou une mauvaise hygiène de vie [109]. Quel que soit la protéine à l'origine de la maladie, la formation de fibres se déroule selon un mécanisme similaire (Figure 3-1).

Au commencement du phénomène, une protéine perd sa structure native pour se réarranger en intermédiaire amyloïdogénique. Ces protéines mal repliées s'assemblent les unes aux autres par formation de feuillets β pour former de petits oligomères solubles. Il s'agit de la phase de nucléation ou «lag phase». Cette conformation de la protéine est en général plus stable thermodynamiquement que la forme native, conduisant à un processus irréversible de formation des fibres [110], [111]. Dans le cas de la maladie l'Alzheimer, cet intermédiaire A β (présentant entre 39 et 43 résidus) est induit par un mauvais clivage protéolytique de la protéine transmembranaire APP (Amyloid Precursor Protein) [112]. Si la fonction biologique de l'APP n'est pas encore totalement élucidée, des études montrent qu'elle serait impliquée dans la formation des synapses [113], dans la plasticité neuronale [114] et dans le transport du fer [115].

La seconde étape du phénomène, appelée phase d'élongation, correspond au réarrangement des oligomères sous forme de protofilaments qui sont ensuite allongés par addition de monomères à leur extrémités et qui s'entrelacent jusqu'à former des fibres matures insolubles [116],[117]. La dernière

phase correspond à l'équilibre entre fibres amyloïdes et monomères. Ainsi, il a été démontré que la vitesse de développement des fibres amyloïdes était limitée par la formation de monomère amyloïdogénique [118].

Quelle que soit la protéine à l'origine de la pathologie, les fibres amyloïdes matures présentent les caractéristiques suivantes : (i) une organisation en fibres de longueurs variables et d'un diamètre de 10 Å; (ii) une structure en feuillets β croisés formant le cœur des fibres; (iv) cette dernière caractéristique confère aux fibres amyloïdes la propriété de fixer des fluorophores organiques tels que le Rouge Congo ou la Thioflavine T [119].

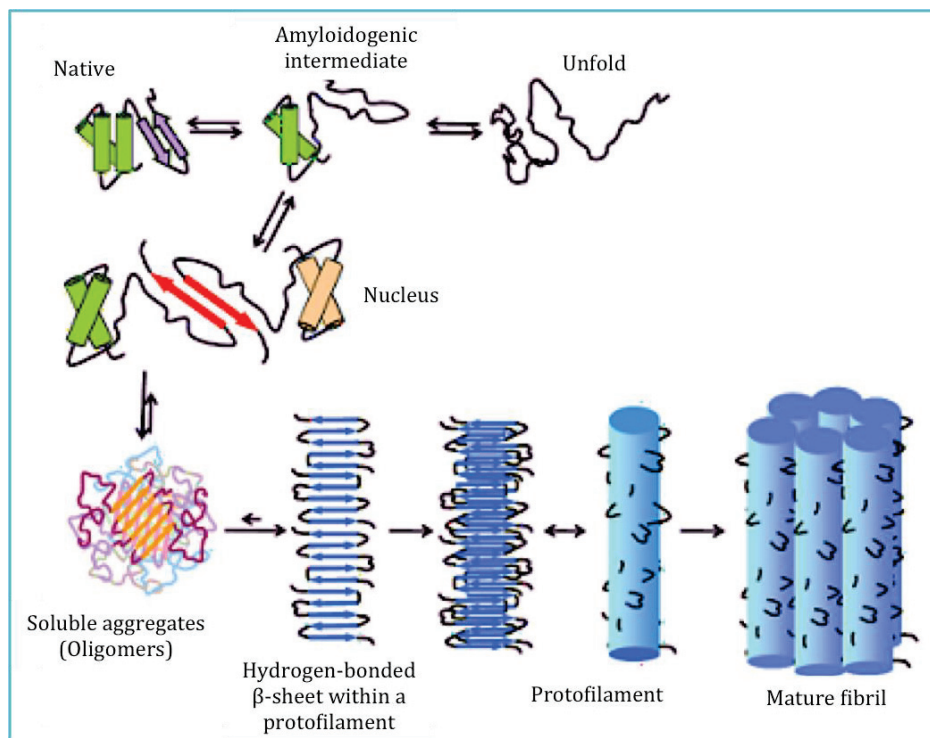


Figure 3-1: De la perte de la conformation native d'une protéine à la formation de fibres amyloïdes. *Issu de* <http://www.cip.ulg.ac.be/newsite/pages/themes/ProteinMisfoldingAggreg.php?id=20> (Consulté le 07-07-2015)

3.1.2.2. EFFETS DE L'AMYLOÏDOSE

Le(s) mécanisme(s) par le(s)quel(s) les fibres amyloïdes induisent les maladies qui leur sont associées ne sont pas encore entièrement élucidés. Dans les stades très avancés de la maladie, la quantité de fibres déposées dans le milieu extracellulaire peut compromettre la fonction d'un organe du fait de leur « encombrement physique » [120]. Par exemple, une déposition importante de fibres amyloïdes dans le cœur entraîne une inélasticité de ce muscle couplée à un phénomène de nécrose [121], [122]. Dans le cas de l'amylose due aux variantes du lysozyme humain, jusqu'à plusieurs kilogrammes de protéine agrégées peuvent s'accumuler dans le foie et provoquer sa rupture. De nombreux travaux ont toutefois montré que les fibres amyloïdes et surtout les espèces oligomériques formées

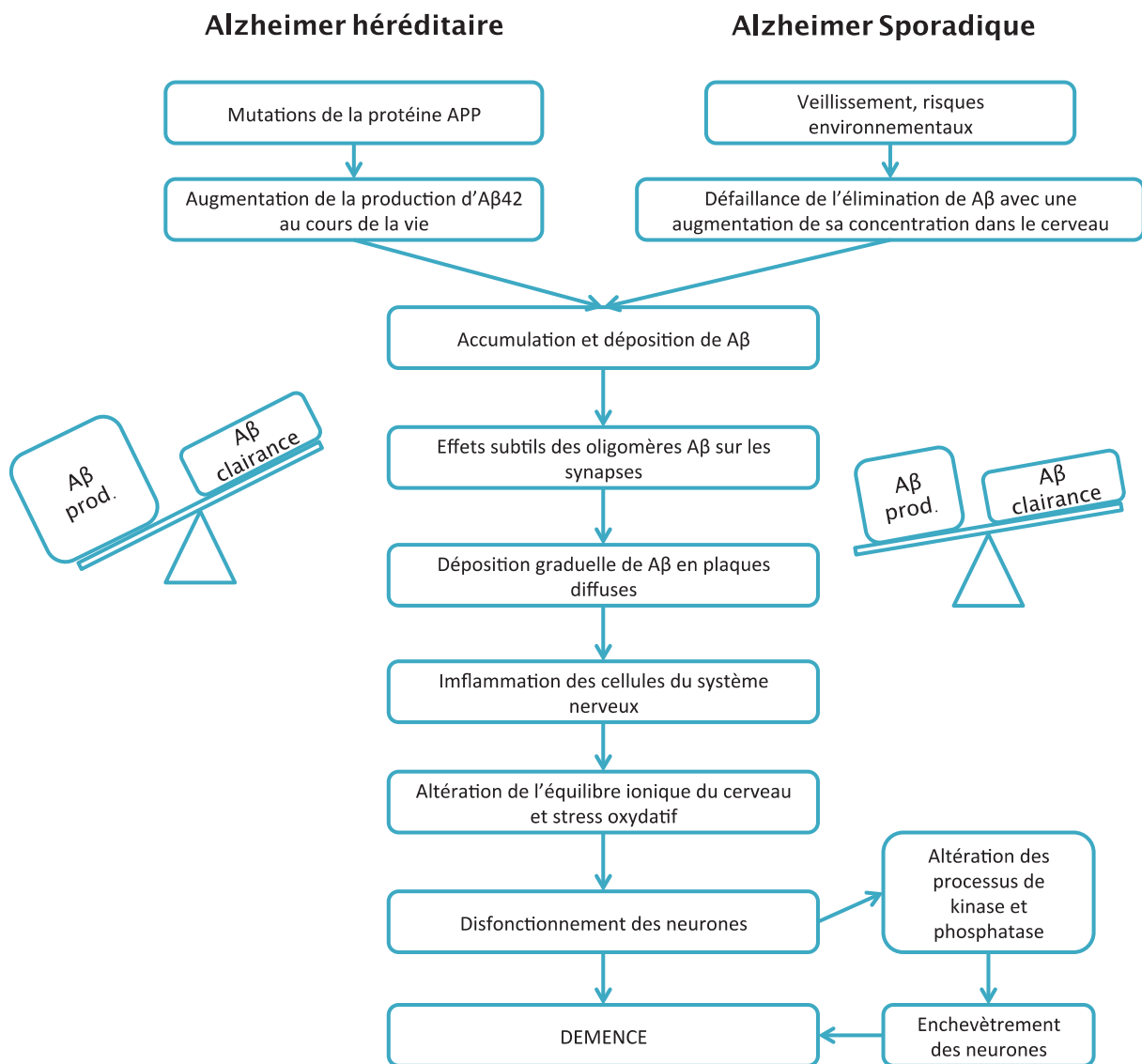


Figure 3-2: Cascade amyloïdogénique. Adapté de Blennow *et al.* [126].

lors des premières étapes du mécanisme d'agrégation sont cytotoxiques [123]. Ces espèces peuvent interagir avec divers composés cellulaires comme les membranes cellulaires ou certains organites, provoquant l'altération de mécanismes physiologiques et déclenchant alors des phénomènes de stress oxydatif, d'inflammation, et pour finir de mort cellulaire *via* apoptose [124], [125].

Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, l'hypothèse du développement de la maladie couramment admise correspond à une « cascade amyloïdogénique » [126] (Figure 3-2). Selon cette hypothèse, l'élément principal de la pathologie vient du déséquilibre entre la production et la clairance d'Aβ, avec une augmentation de la production d'Aβ dans le cas de l'Alzheimer héréditaire, et une diminution de l'élimination des peptides Aβ dans le cas de l'Alzheimer sporadique. Les oligomères et plaques d'Aβ peuvent diminuer la plasticité des synapses et provoquer des réactions d'inflammation

et de stress oxydatif. Ce phénomène a pour conséquence la défaillance des fonctions neuronales et synaptiques conduisant à une dysfonction neuronale et à l'apparition de syndromes cognitifs. Il se passe environ 20 à 30 ans entre l'apparition des premiers oligomères amyloïdogéniques et les premiers symptômes de troubles cognitifs [127].

3.1.2.3. DIAGNOSTIC ET TRAITEMENT D'ALZHEIMER : ETAT DES LIEUX

Aujourd'hui, le diagnostic d'une amyloïdose ne peut être affirmé avec certitude qu'après réalisation d'une biopsie. Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, celle-ci ne peut avoir lieu que *post mortem*. Un diagnostic Alzheimer « probable » découle des résultats d'une série de tests cognitifs. Toutefois, les techniques d'imagerie médicale peuvent déjà fournir des informations pour corroborer le diagnostic.

Par exemple, l'IRM permet d'observer l'atrophie du lobe temporal, caractéristique des maladies neurodégénératives, et de proposer un diagnostic d'AD probable à 80%-90%. La tomographie à émission de positron (TEP), permet également d'observer une hypométabolisation des zones après injection de [^{18}F]Fluorodésoxyglucose (FDG) [128].

Les traitements actuellement proposés aux patients sont surtout d'ordre à limiter leurs troubles cognitifs (ex : Memantine, Galantamine, Donepezil) [101]. Toutefois, de nombreux traitements agissant sur les causes de la maladie, et non sur les symptômes, sont actuellement en cours de développement. Il s'agit notamment de réduire la production et/ou l'agrégation du peptide A β ; d'améliorer la clairance d'A β ; ou encore de limiter l'agrégation de la protéine Tau.

Quel que soit le traitement choisi, il est admis que plus celui-ci est administré à des stades précoces de la maladie, plus les chances de guérison et de limitation du développement de la maladie seront importantes. Dans ce cadre, il apparaît donc primordial de développer de nouveaux outils afin de proposer un diagnostic fiable et précoce de l'apparition de pathologies amyloïdes, bien avant les premiers symptômes. Pour atteindre ce but, notre stratégie est de fixer sur les nanoparticules d'imagerie multimodales AGuIX des vecteurs ciblant spécifiquement des fibres amyloïdes. Ainsi, dans la partie suivante, nous nous intéresserons aux différents agents (molécules, peptides, anticorps), présentant une affinité particulière pour ces fibres.

3.1.3. STRATEGIES DE CIBLAGE DES FIBRES AMYLOÏDES

De nombreuses recherches ont été effectuées afin de développer des vecteurs ciblant spécifiquement les fibres ou intermédiaires amyloïdes. Plusieurs familles de vecteurs ont ainsi vu le jour : i) des molécules organiques ; ii) des peptides dont le motif d'acides aminés est inspiré de celui de la protéine amyloïdogénique, iii) des anticorps ou fragments d'anticorps spécifiques de la protéine

amyloïdogénique ou des fibres amyloïdes. Devant le grand nombre de vecteurs ciblant développés, seul les agents ciblant utilisés au cours de la thèse seront explicités.

Trois voies de ciblage ont été développées afin de vectoriser les Nps AGuIX. La première fait appel à des fragments d'acides aminés dont la séquence est directement inspirée de la protéine amyloïdogénique, dans le but de reconnaître spécifiquement un type de fibres.

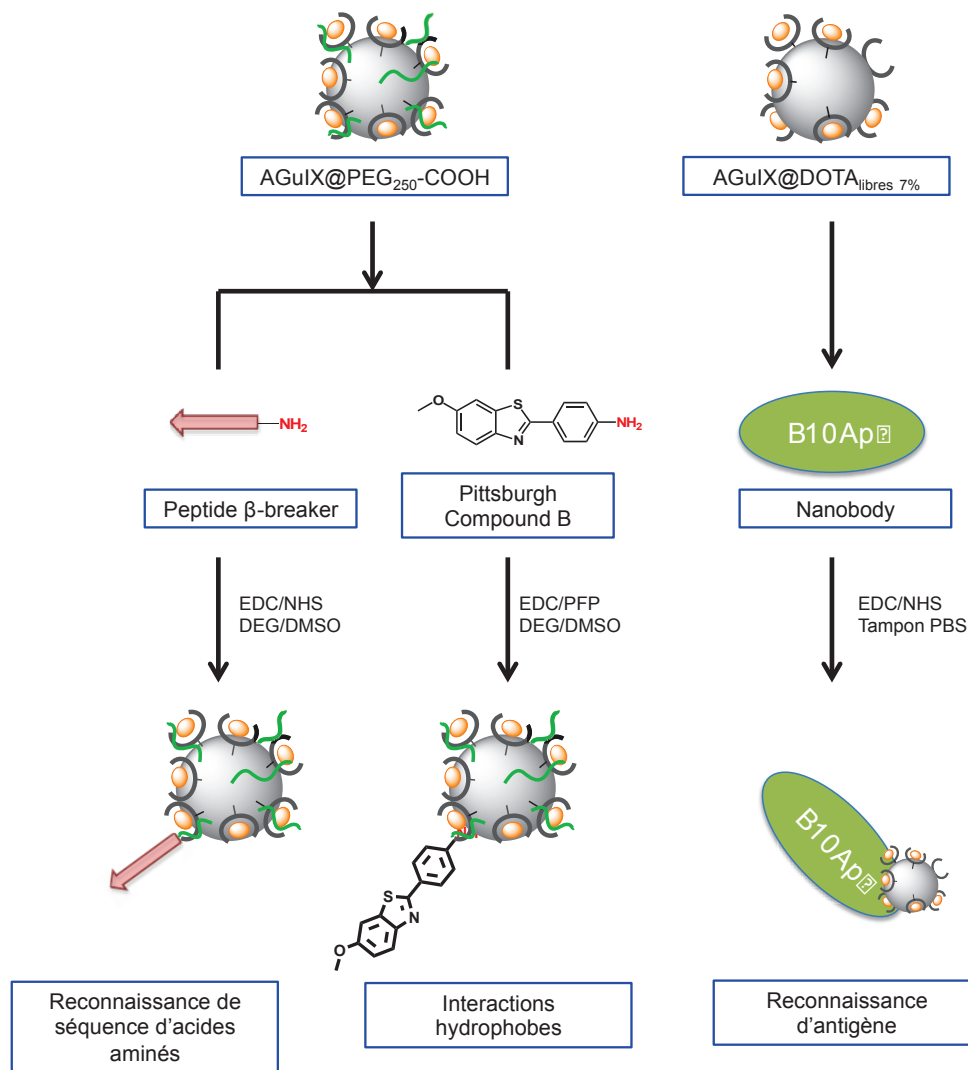


Figure 3-3: Stratégies de ciblage des fibres amyloïdes

La seconde utilise le Pittsburgh compound B, une molécule organique dérivée de la Thioflavine T, un marqueur d'histologie reconnu pour la détection des dépôts amyloïdes. L'objectif de ce vecteur est de proposer un outil général de reconnaissance de tous les dépôts amyloïdes, quel que soit le type de protéine à l'origine de la pathologie. Enfin, la dernière stratégie consiste à greffer un nanobody, le plus petit site de reconnaissance d'antigène naturel, spécifique d'une conformation en protofilaments ou fibres matures.

Ces différents vecteurs peuvent tous permettre un ciblage potentiel des fibres amyloïdes *in vitro* ou *in vivo*. Ils ont chacun été greffés sur les nanoparticules AGuIX *via* leur amine primaire. Après avoir été caractérisés, leur affinité pour les fibres a été testée *in vitro* par résonance plasmonique de surface, par histologie ou par DOT blot, le but étant de dégager le meilleur candidat parmi ces trois stratégies.

3.2. MESURE DE L’AFFINITE DES NANOPARTICULES VECTORISEES POUR LES FIBRES AMYLOÏDES PAR RESONANCE PLASMONIQUE DE SURFACE (SPR)

La technologie Biacore® a émergé comme un outil de choix pour les biochimistes. En effet, cette technique permet, grâce au phénomène de résonance plasmonique de surface, d’analyser en temps réel des interactions biologiques sans recourir à un marqueur (ex : fluorescent, radioactif, ...) et avec une excellente sensibilité [129]. Cette technique a donc été utilisée au cours de la thèse afin de caractériser l’affinité des nanoparticules AGuIX vectorisées pour les fibres amyloïdes. Les manipulations ont été menées au sein de l’équipe I2B du Professeur Richard Cohen, rattaché à l’institut MATEIS, en collaboration avec Laurence Heinrich-Balard (MCF) et Pascaline Rivory (Ingénieure d’Etude).

3.2.1. PRINCIPE DE LA SPR

La SPR (Surface Plasmon Résonance) ou *Résonance Plasmonique de Surface* est un phénomène physique au cours duquel les électrons d’une surface métallique (par exemple à base de fer ou d’or) oscillent collectivement sous la stimulation d’un rayonnement lumineux dans des conditions de réflexion totale (Figure 3-4).

3.2.1.1. PHENOMENE DE REFLEXION TOTALE

Lorsqu’un rayonnement lumineux polarisé atteint une interface entre deux milieux d’indices de réfraction différents n_1 et n_2 , une partie de la lumière est réfléchi, tandis que l’autre partie est réfractée suivant un angle décrit par la loi de Snell-Descartes (Figure 3-4):

$$n_1 \sin(\theta_1) = n_2 \sin(\theta_2)$$

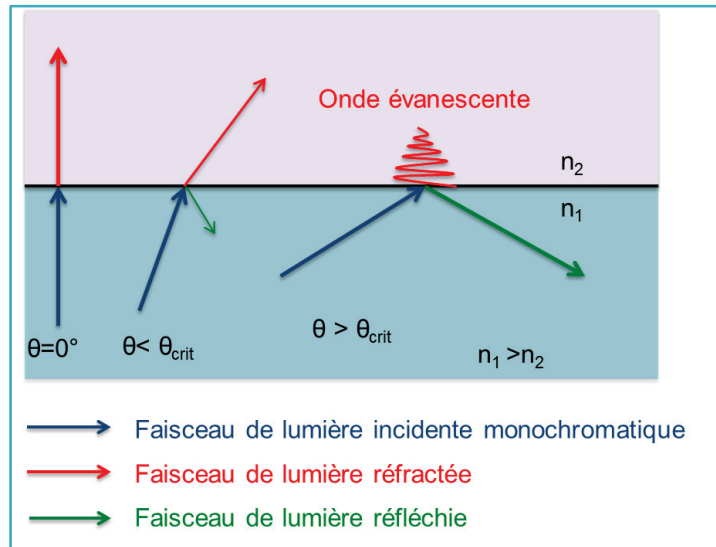


Figure 3-4: Conditions pour une réflexion totale

Dans le cas où l'indice de réfraction n_1 du milieu traversé par le rayon incident est supérieur à celui de l'autre milieu, il peut se produire un phénomène de réflexion interne totale. Concrètement, lorsque l'angle avec lequel le faisceau lumineux frappe l'interface est nul, la lumière traverse la surface. Plus cet angle augmente, plus le faisceau de lumière réfracté se rapproche de l'interface, jusqu'à ce qu'il devienne exactement parallèle à celle-ci pour un angle critique θ_{crit} . Pour chaque angle supérieur à cette valeur critique, la lumière sera totalement réfléchi. Lorsque ce phénomène se produit, le champ électrique des photons traverse l'interface sous forme d'une onde évanescente sur une distance environ égale à la longueur d'onde du rayon incident $\lambda(nm)$ [130],[131].

3.2.1.2. RESONANCE PLASMONIQUE

Si l'interface entre les deux milieux est recouverte d'une fine couche métallique, il existe un angle spécifique θ_{SPR} , où les électrons de surface de celle-ci peuvent entrer en résonance avec le champ électrique des photons issus du rayon incident : il s'agit de la résonance plasmonique de surface (Figure 3-5). Ce phénomène a pour conséquence une chute drastique de l'intensité de la lumière réfléchi.

L'angle spécifique θ_{SPR} où se produit la résonance plasmonique dépend des indices de réfraction de chaque milieu selon la formule [132], où n_1 , n_2 et n_g représentent les indices de réfraction du milieu 1, du milieu 2 et de la surface métallique respectivement:

$$\theta_{SPR} = \sin^{-1} \left(\frac{1}{n_1} \sqrt{\frac{n_2^2 n_g^2}{n_2^2 + n_g^2}} \right)$$

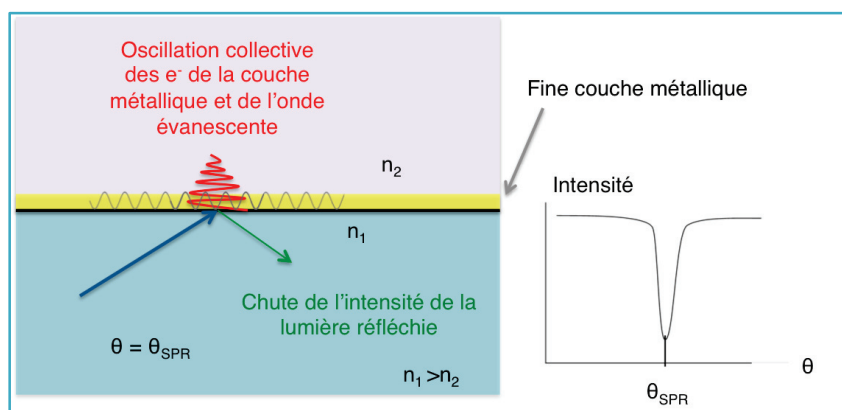


Figure 3-5 : Effet plasmonique de surface : oscillation collective des électrons de la couche métallique et de l'onde évanescente conduisant à une chute drastique de l'intensité de la lumière réfléchie.

Ainsi, un changement de l'indice de réfraction n_2 dans le voisinage direct de la couche d'or, causé par exemple par l'adsorption d'une molécule, entraîne une variation de l'angle pour lequel l'intensité du faisceau réfléchi est minimale (Figure 3-5).

Pour pouvoir générer un effet plasmon, le métal doit être riche en électrons et ceux-ci doivent pouvoir entrer en résonance avec la lumière à des longueurs d'ondes adaptées, c'est le cas de l'argent, de l'or, du cuivre, de l'aluminium, du sodium et de l'indium [133]. Toutefois, ces métaux doivent être exempts de sulfites ou d'oxydes et être inertes vis-à-vis des solutions mises à leur contact. Parmi ces métaux : le prix de l'indium est particulièrement élevé, le sodium est trop réactif, l'argent est trop susceptible de subir des réactions d'oxydation et le cuivre et l'aluminium possèdent une bande plasmonique trop large. Ainsi, dans une immense majorité des cas, le choix du métal se porte sur l'or.

3.2.2. LA TECHNOLOGIE BIACORE

La technologie Biacore® (Figure 3-6) permet d'étudier les interactions entre différentes cibles biologiques grâce au suivi en temps réel des variations de l'angle de résonance plasmonique. Cet appareil est composé d'un capteur recouvert d'une fine couche d'or. Cette surface métallique est fonctionnalisée par du dextran carboxyméthylé afin de permettre le greffage covalent d'un récepteur d'intérêt. L'échantillon contenant l'analyte circule directement sur cette surface.

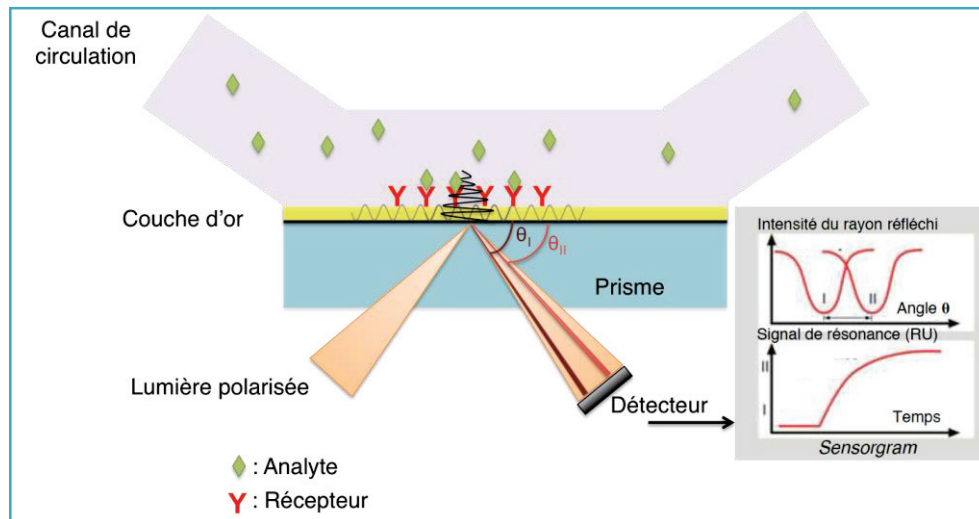


Figure 3-6 : Illustration de la technologie Biacore® : les interactions entre les analytes et les ligands fixés sur la puce d'or entraînent des variations de l'angle de résonance plasmonique.

Dans le cas d'une interaction entre le récepteur et le ligand, l'indice de réfraction n_2 au voisinage direct de la surface d'or est modifié, entraînant un décalage de l'angle de résonance plasmonique. Or, ces variations sont linéaires avec la quantité d'analyte adsorbé sur la puce [134], [135]. Le signal de résonance est converti en unité de résonance (R.U.) permettant ainsi de suivre en temps réel les interactions entre l'analyte et la cible sous la forme d'un *sensorgramme* (Figure 3-7). Cette technique est extrêmement sensible puisqu'une variation de 1000 R.U. correspond à un décalage de l'angle de résonance de seulement $0,1^\circ$ [136].

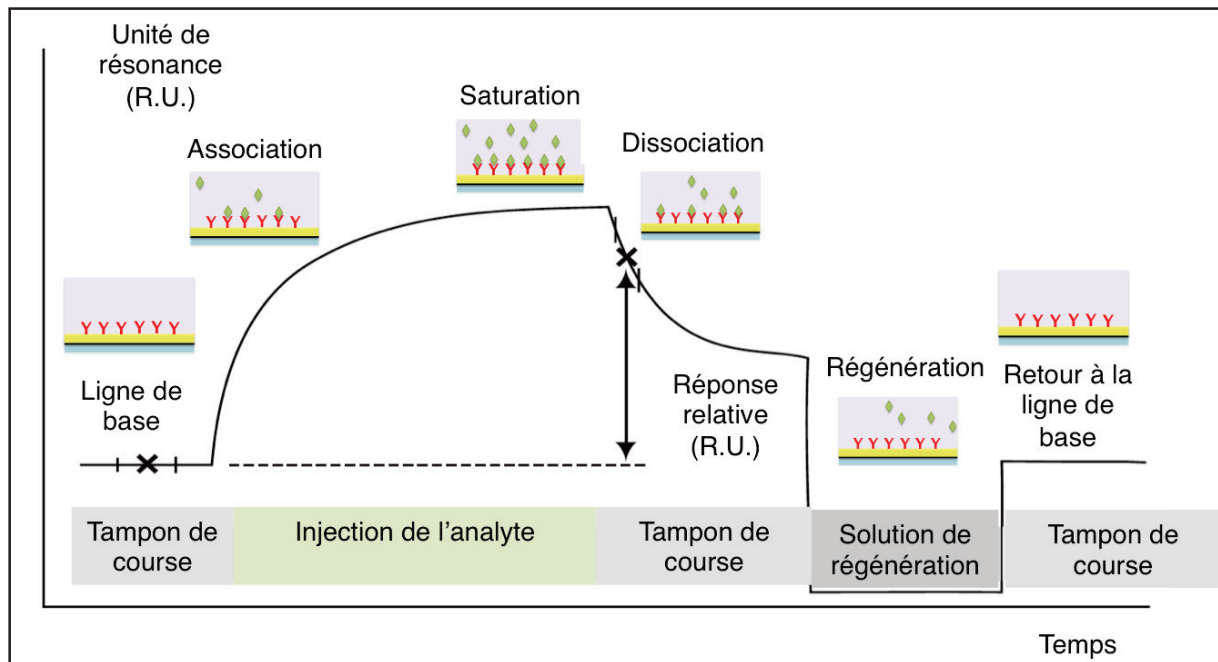


Figure 3-7: Sensorgramme classique obtenu après injection d'un analyte.

Le *sensorgramme* obtenu après injection de l'analyte se décompose en différentes étapes. Tout d'abord, seul du tampon de course circule sur la puce et le nombre de R.U. mesuré correspond à la ligne de base. Après injection de l'échantillon, l'analyte se fixe peu à peu sur les récepteurs de la puce conduisant à une augmentation du signal jusqu'à l'obtention d'un plateau correspondant à la saturation des sites de la puce. La surface est ensuite rincée par le tampon de course. Cette étape permet de décrocher les analytes adsorbés sur la puce par des interactions très faibles et/ou non spécifiques, mais conserve les molécules ayant une affinité pour la cible.

Pour décrocher les molécules présentant une affinité très forte pour la cible, il est nécessaire de rincer la puce par une solution de régénération. Celle-ci doit permettre de déstabiliser les interactions fortes (ex : de type ionique, hydrophobe...) sans endommager les récepteurs immobilisés sur la surface. Enfin, la puce est rincée par la solution de tampon de course et le signal observé retourne à la ligne de base.

3.2.2.1. DETERMINATION D'UNE CONSTANTE DE DISSOCIATION K_D

Le Biacore® permet de déterminer l'affinité entre un ligand (L) et un récepteur (R), ici les fibres amyloïdes immobilisées et les nanoparticules en circulation. Cette affinité est caractérisée par la constante de dissociation K_D (M) entre ces deux espèces, qui correspond à la concentration en ligand nécessaire pour occuper 50 % des récepteurs. Le processus réversible d'association entre ces deux espèces est défini par la formule suivante :

$$K_D = \frac{[R][L]}{[RL]}$$

La valeur de la constante de dissociation doit idéalement être la plus faible possible. Concrètement, on parle d'interaction faible pour des K_D de l'ordre de 10^{-3} M et d'interaction particulièrement forte pour des K_D inférieurs 10^{-9} M.

Selon l'ordre de la réaction d'association entre le ligand et le récepteur, plusieurs modèles mathématiques ont été développés [137]. Pour décrire l'association entre les différentes nanoparticules vectorisées et les fibres amyloïdes, nous avons choisi d'utiliser un modèle d'association 1:1, le plus simple à mettre à place, afin de comparer les différentes stratégies de ciblage actif. Le modèle de Michaelis-Menten d'ordre 1 nous a ainsi permis de corréler le nombre d'unité de résonance (R.U.) et la concentration en nanoparticules ou agents ciblant d'après la formule :

$$R.U = R_{max} \frac{[analyte]}{K_D + [analyte]}$$

Où R_{\max} représente le nombre d'unité de résonance maximum immobilisable sur la puce.

3.2.3. IMMOBILISATION DES FIBRES AMYLOÏDES

Le but des analyses Biacore® est d'étudier l'affinité des nanoparticules vectorisées par les différents ligands susceptibles de cibler les fibres amyloïdes. Nous avons ainsi fonctionnalisé des puces d'or par des fibres issues des protéines suivantes : A β , TTR et α -synucléine.

3.2.3.1. CHOIX DE LA PUCE BIACORE®

Plusieurs types de puces sont disponibles commercialement, toutes comportant quatre canaux pouvant être fonctionnalisés. Selon la nature des récepteurs à immobiliser et /ou des propriétés de l'analyte, le choix s'effectuera entre i) différents types de polymères de surface (ex : dextran carboxyméthylé, streptavidine, polymère hydrophobe), ii) différentes épaisseurs de polymères, iii) différentes fonctions réactives de surface (ex : amine, acide carboxylique, thiol, ...) [129]. Notre choix s'est porté sur une puce CM3, c'est à dire une puce d'or fonctionnalisée par une couche de dextran carboxyméthylé la plus fine disponible. Ce revêtement présente des acides carboxyliques permettant le greffage covalent des fibres amyloïdes par couplage peptidique *via* les amines libres disponibles de celles-ci. La faible longueur des chaînes de dextran permet d'obtenir un meilleur signal en rapprochant la cible de l'onde évanescente située au niveau de la surface d'or.

3.2.3.2. SONICATION PREALABLE DES FIBRES AMYLOÏDES

Les échantillons à analyser circulent par un système microfluidique faisant partie intégrante de la puce Biacore®. Or, les fibres amyloïdes matures peuvent atteindre une longueur supérieure à plusieurs dizaines de micromètres. Afin d'éviter de boucher le système microfluidique et d'endommager la puce, les fibres amyloïdes sont préalablement soniquées avant d'être immobilisées [138]. Cette étape est réalisée grâce à la pointe à ultrasons SONOPLUS HD 2070. La sonication des fibres, placées dans un bain de glace, dure 20 secondes (Impulsion pendant 0,6 s, suivie de 0,4 s d'interruption en mode PULSE, cycle 6, 40W).

L'influence des ultrasons sur la morphologie des fibres a été contrôlée par Microscopie Electronique à Transmission (MET) après coloration négative par 1%_{volumique} d'acétate d'uranyle sur des grilles Cuivre-Formvar-Carbone (Figure 3-8). Les clichés ont été réalisés au Centre Technologique des Microstructures de Lyon (CTμ) sur un microscope Philips CM 120 à 80 kV.

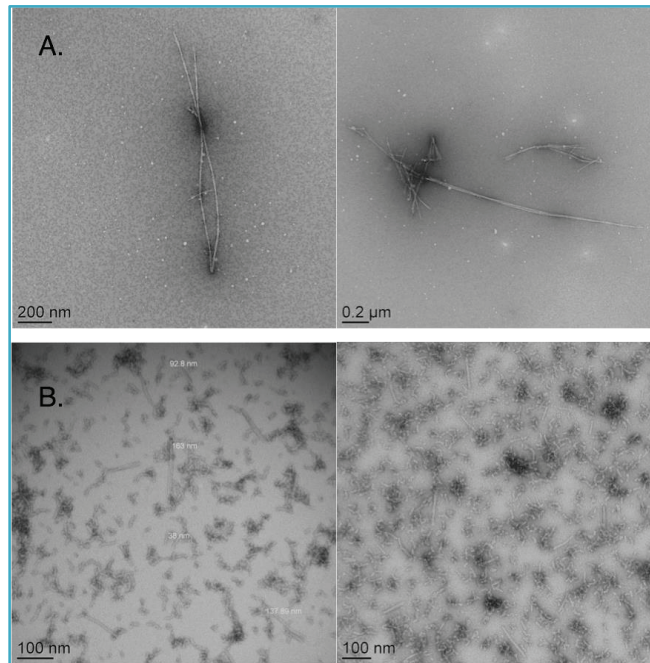


Figure 3-8 : A. Image TEM de fibres Amyloïdes A β avant sonication ; B. après sonication.

Ces images montrent que la longueur des fibres a été significativement réduite lors de l'étape de sonication. Afin de contrôler que cette étape n'a pas dénaturé la structure en feuillet β des fibres amyloïdes, des analyses de dichroïsme circulaire ont été réalisées au sein de l'équipe AFFOND du CEA de Grenoble (Figure 3-9). Cette technique permet notamment d'obtenir la structure secondaire des protéines en solutions (Voir §3.3.3.2.1).

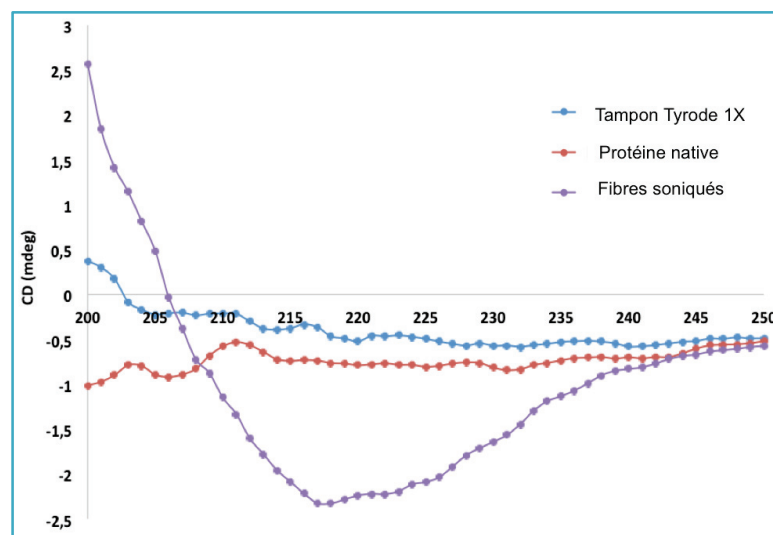


Figure 3-9: Spectres d'absorption en dichroïsme circulaire des fibres Amyloïdes A β soniquées, de la protéine native A β , et du tampon Tyrode 1X.

Pour le tampon ou pour la protéine A β sous forme dénaturée, aucun pic caractéristique n'est observé. Au contraire, la solution de fibres A β soniquées présente un pic négatif aux alentours de 217 nm. Ce minimum est caractéristique d'une structure en feuillets β [139], [140]. Ainsi, nous pouvons affirmer que si l'étape de sonication permet de réduire significativement la longueur des fibres, celles-ci ne sont pas dénaturées par les ultrasons. Les fibres soniquées peuvent alors être immobilisées sur la puce d'or sans risque pour l'appareil.

3.2.3.3. IMMOBILISATION DES FIBRES SUR LA PUCE

L'immobilisation covalente des fibres est effectuée par couplage amine *via* EDC/NHS entre les acides carboxyliques issus du dextran carboxyméthylé et les amines primaires disponibles issues des peptides. Or, cette réaction a lieu en flux continu de solvant. Il est donc nécessaire de bien choisir le pH du tampon de course afin de produire une interaction électrostatique entre le dextran chargé négativement et les fibres à déposer. Une fois ces paramètres établis (Tableau 3-2), les chaînes de dextran sont activées par le couple EDC/NHS, puis fonctionnalisées par les fibres. Enfin, les fonctions acides carboxyliques n'ayant pas réagi sont désactivées par couplage avec de l'éthanolamine. Chaque puce comportant quatre canaux, nous avons déposés des fibres sur les canaux 2 et 4 et uniquement immobilisé de l'éthanolamine sur les canaux 1 et 3, qui serviront de référence et nous permettront d'observer les interactions non-spécifiques entre les nanoparticules et le dextran. Pour les calculs d'affinité réalisés sur ces puces Biacore® le signal non spécifique du canal de référence (ex : FC1) est soustrait au signal obtenu sur le canal fonctionnalisé (FC2).

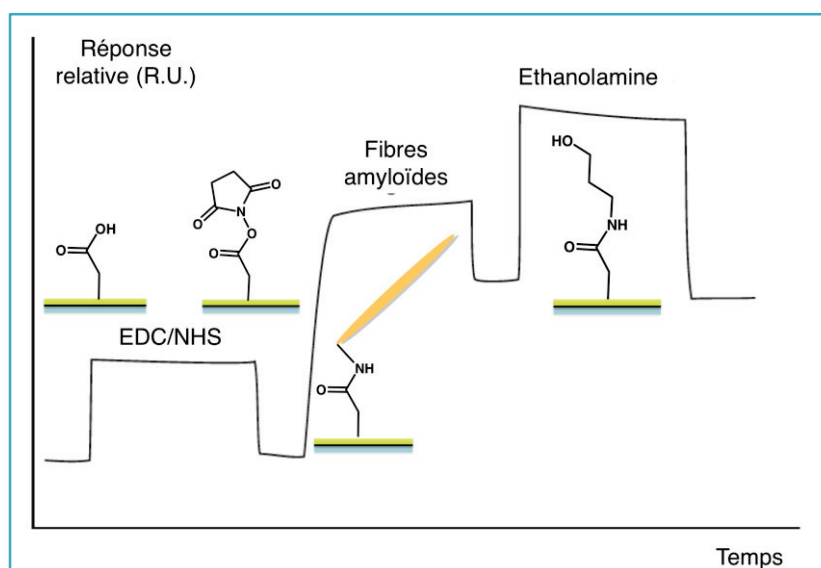


Figure 3-10: Immobilisation des fibres amyloïdes soniquées sur la puce Biacore recouverte de dextran carboxyméthylé par activation EDC/NHS, suivie d'une saturation des fonctions acides carboxyliques n'ayant pas réagi par de l'éthanolamine.

Le niveau d'immobilisation des fibres sur les différents canaux est mesuré en unités de résonance (R.U.), reportées dans le tableau suivant.

Tableau 3-2: Niveau et conditions d'immobilisation des différentes fibres amyloïdes testées.

Type de fibres	Tampon de course	pH	Nombre de R.U. immobilisés
A β	Acétate de sodium	4	1200
TTR	Acétate de sodium	5,5	800
α -Synucléine	Acétate de sodium	4	2000

Les taux d'immobilisation obtenus confirment que les différentes fibres amyloïdes ont bien été greffées sur la puce Biacore®. Toutefois, afin de vérifier que ce processus n'a pas induit de détérioration des fibres, un test préliminaire de reconnaissance est effectué à l'aide du Rouge Congo.

3.2.3.4. VALIDATION DE LA PUCE PAR LE ROUGE CONGO

Le Rouge Congo (RC) est un marqueur d'histologie historique des fibres amyloïdes [141]. Tout comme la Thioflavine T, il est couramment utilisé pour marquer des dépôts *ex vivo* de fibres amyloïdes en fluorescence.

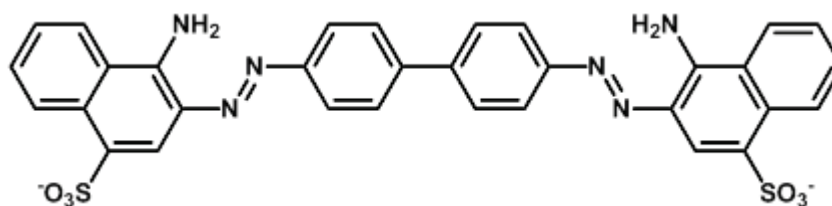


Figure 3-11 : Molécule de Rouge Congo

En 2008, Maezawa et al. déterminent sa constante de dissociation pour des fibres A β (1-42) par SPR ($K_D = 19,5 \mu\text{M}$) [142]. Nous nous sommes donc inspirés de leur protocole afin de valider les puces fonctionnalisées par les différentes fibres amyloïdes. Le Rouge Congo a ainsi été testé sur les fibres A β et TTR à différentes concentrations allant de 3,6 nM à 50 μM en solution dans le tampon HBS-P.

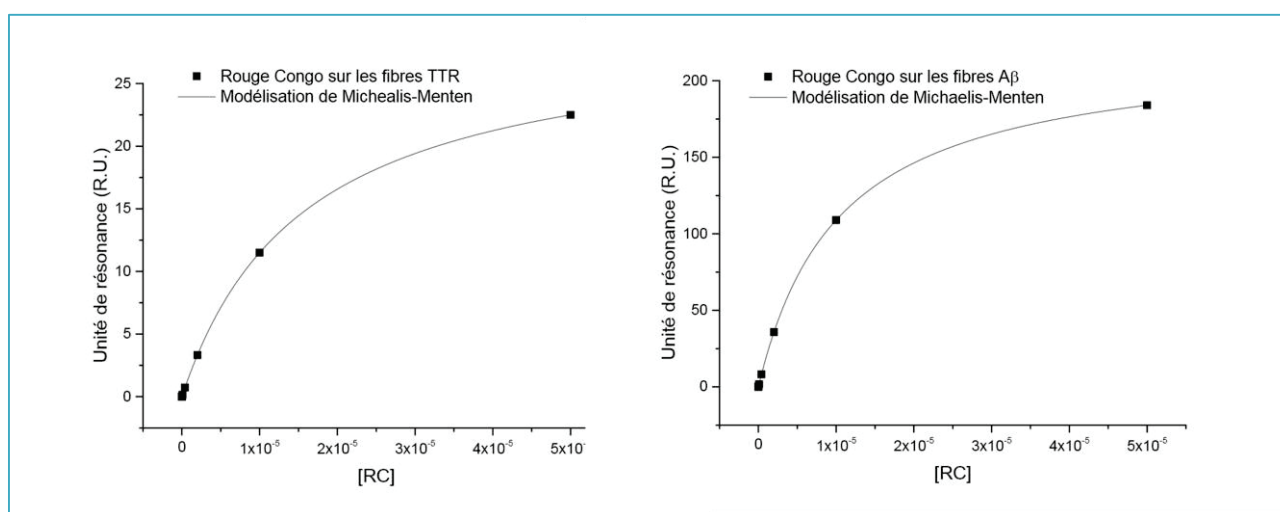


Figure 3-12 : Réponses (en R.U.) du Rouge Congo à différentes concentrations sur la puce CM3 fonctionnalisée par 800 R.U. de fibres TTR (gauche) et 1200 R.U. de fibres A β (droite), modélisées par le modèle d'association 1 :1 de Michaelis-Menten.

Les réponses obtenues sont modélisées selon le modèle d'association 1 :1 de Michaelis-Menten (Voir partie suivante). Les constantes de dissociation du rouge Congo déterminées expérimentalement sont de 10,4 μM pour les fibres A β et de 10,4 μM pour les fibres TTR. Ces valeurs, très proches de celles proposées par Maezawa *et al.* prouvent que les puces Biacore® sont bien fonctionnalisées par des fibres amyloïdes. Celles-ci sont ainsi validées pour le test des différentes nanoparticules vectorisées.

3.3. VECTORISATION PAR LES PEPTIDES β -BREAKER

3.3.1. PEPTIDES β -BREAKER

Une stratégie de ciblage des fibres amyloïdes consiste à utiliser de petits peptides (de 5 à 10 acides aminés) dont la séquence est directement inspiré de celle de la protéine amyloïdogénique.

Cette stratégie a été mise en place par Tjernberg *et al.* avec le pentapeptide KLVFF [7]. Cette chaîne d'acides d'aminés correspond au motif A β (16-20), c'est à dire à la région du peptide formant le cœur de la fibre amyloïde (i.e. la structure beta-croisée) [143] (Figure 3-13.a). Le mode de liaison du

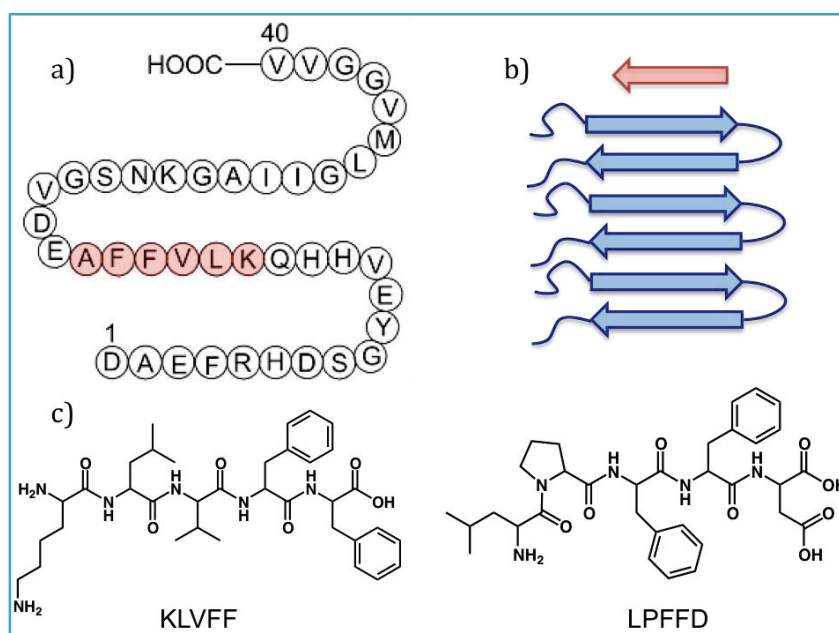


Figure 3-13: a) Séquence d'acides aminés du peptide A β (1-40) avec la zone hydrophobe participant aux feuilletts β en rouge ; b) Mode de liaison des fragments de peptides β -breaker ; c) Structure de KLVFF et LPFFD.

peptide KLVFF avec les fibres repose sur des interactions ioniques et hydrophobes et se produit à l'extrémité des fibres (Figure 3-13.b). Initialement, ce peptide a été présenté comme permettant d'inhiber la croissance des fibres *in vitro*. Cependant, après les nombreuses études réalisées, cette conclusion ne fait plus l'unanimité et certaines équipes avancent au contraire que ce peptide pourrait agir comme un élément de nucléation du processus d'agrégation des fibres A β *in vitro* [144]. L'affinité de ce peptide pour les fibres A β est modérée avec un K_D de $1.4 \pm 0,9$ mM [145] (obtenue par Résonance Plasmonique de Surface).

Cette stratégie a été adaptée par Soto *et al.* pour sélectionner des peptides permettant d'inhiber efficacement l'élongation des fibres. Cette équipe s'est inspirée de la zone hydrophobe A β (17-21) de motif LVFFA pour tester le peptide LPFFD. En substituant la valine par la proline, un acide aminé cyclique connu pour déstabiliser les structures β [146], ils sont parvenus *in vitro* non seulement à

inhiber la formation des fibres, mais également à désassembler des fibres préformées [6]. De plus, ce peptide a montré la propriété d'inhiber la déposition de plaques A β *in vivo* chez un modèle de murin de la maladie d'Alzheimer [147]. L'affinité de ce peptide pour les fibres A β est supérieure à celle de KLVFF avec un K_D de 156 μ M [148] (obtenue par Résonance Plasmonique de Surface).

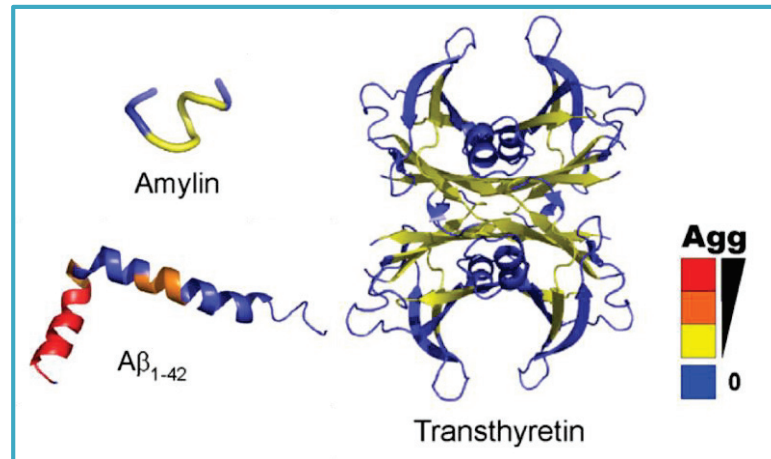


Figure 3-14: Protéines amyloïdogéniques A β , responsable de l'AD ; Amyline, responsable du diabète de type II et Transthyréine, responsable de neuropathie et de cardiomyopathie [106].

La même stratégie peut être adaptée au ciblage d'autres types de fibres amyloïdes. Au cours de la thèse, des fragments peptidiques issus des protéines transthyréine et amyline ont été testés comme vecteurs potentiels des fibres correspondantes (Figure 3-14).

3.3.2. PUBLICATION

La vectorisation des nanoparticules AGuIX a donné lieu à une publication soumise prochainement dans la revue Nanoscale.

Gd-nanoparticles functionalization with specific peptides for β - amyloid fibrils targeting

**Marie Plissonneau^{2,3,#}, Jonathan Pansieri^{1,#}, Laurence Heinrich-Balard⁴, Jean-François Morfin⁵,
Nathalie Stransky-Heilkron⁶, Pascaline Rivory⁴, Pierre Mowat¹, Mireille Dumoulin⁷,
Richard Cohen^{4,8}, Éric Allémann⁶, Éva Tóth⁵, Maria Joao Saraiva⁹, Cédric Louis², Olivier Tillement³,
Vincent Forge¹, François Lux³, Christel Marquette^{1*}**

*1-Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, Université Grenoble Alpes, CEA Life Science Division,
CNRS, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France*

2-Nano-H S.A.S , F-38070 Saint Quentin Fallavier, France

*3-Institut Lumière Matière UMR5306 CNRS Université Claude Bernard Lyon 1, Domaine Scientifique de
La Doua, 2 rue Victor Grignard 69622 Villeurbanne cedex, France*

*4 - Université de Lyon, Lyon, France 4bis - MATEIS UMR CNRS 5510, ISPB Faculté de Pharmacie, 69373
Lyon, France*

*5- Centre de biophysique moléculaire - UPR 4301- Rue Charles Sadron CS 80054 45071 Orléans
cedex 2, France.*

*6- School of pharmaceutical sciences University of Geneva, University of Lausanne
Pharmaceutical technology, Quai Ernest-Ansermet 30 1211 GENEVA, Switzerland*

*7-Centre for Protein Engineering, Laboratory of Enzymology and Protein Folding Institut of Chemistry,
B6 University of Liege Sart Tilman, 4000 LIEGE, Belgium*

8 -Hospices Civils de Lyon, Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Lyon, France

*9-Molecular Neurobiology Group, Institute of Biology, Molecular & Cellular, R. Campo Alegre 823
4150 Porto, Portugal*

#Equal contribution.

**Corresponding author: christel.marquette@cea.fr*

ABSTRACT

Amyloidoses are characterized by the extracellular deposition of insoluble fibrillar proteinaceous aggregates highly organized into cross- β structure and referred to as amyloid fibrils. Nowadays, the diagnosis of these diseases remains tedious and involves multiple examinations while an early and accurate protein typing is crucial for the patients' treatment. Routinely used neuroimaging techniques such as magnetic resonance imaging (MRI) and positron emission tomography (PET) using Pittsburgh compound B, [^{11}C]PIB, provide structural information and allow to assess the amyloid burden, respectively, but cannot discriminate between different amyloid deposits. Therefore, the availability of efficient multimodal imaging nanoparticles targeting specific amyloid fibrils would provide a minimally-invasive imaging tool useful for amyloidoses typing and early diagnosis. In the present study, we have functionalized gadolinium-based MRI nanoparticles (AGuIX) with peptides highly specific for A β amyloid fibrils, LPFFD and KLVFF. The capacity of such nanoparticles grafted with peptide to discriminate among different amyloid proteins, was tested with A β (1-42) fibrils and with mutated-(V30M) transthyretin (TTR) fibrils. The results of surface plasmon resonance studies showed that both functionalized nanoparticles interact with A β (1-42) fibrils with equilibrium dissociation constant (K_d) values of 403 μM and 350 μM respectively, whilst they did not interact with V30M-TTR fibrils. Thereafter, the ability of functionalized nanoparticle to target and bind selectively A β aggregates was further investigated by immunohistochemistry on AD like-neuropathology brain tissue. Pictures clearly indicated that KLVFF-grafted or LPFFD-grafted to AGuIX nanoparticle recognized and bound the A β amyloid plaque localized in the mouse hippocampus. These results constitute a first step for considering these functionalized nanoparticles as a valuable multimodal imaging tool to selectively discriminate and diagnose amyloidoses.

INTRODUCTION

Amyloidoses constitute a wide range of human diseases which are related to the conversion of soluble proteins into well-organized and insoluble fibrillar deposits, due to protein misfolding and self-association into amyloid aggregates enriched with cross- β sheet structures¹ (Figure 1A).

There are approximately 40 disorders associated with amyloid fibril formation and deposition in the extracellular space of various organs and tissues. They include neurodegenerative diseases (e.g. Alzheimer's disease, AD), systemic amyloidoses (e.g. familial amyloid polyneuropathy, FAP) and localized amyloidoses (e.g. type II diabetes). Each disorder has a distinct clinical profile and is associated with the aggregation of a predominant peptide or protein², i.e. amyloid- β peptide (A β) in

AD, transthyretin (TTR) in FAP, or amylin in type II diabetes. Currently, the diagnosis of amyloidoses is established from the results of multiple invasive examinations^{3,4}, and is complicated by the involvement of several organs, and by the fact that symptoms are unspecific. In recent years, amyloidoses attracted considerable interest from scientists in different disciplines, resulting in a better understanding of their pathogenesis and of the molecular mechanisms of amyloid formation. This knowledge has led to important advances useful for designing new tools to achieve early and reliable diagnosis of these pathologies.

Alzheimer's disease is the most common age-related neurodegenerative disease and the major cause of dementia in the elderly population. The number of people living with dementia worldwide is estimated at 44 million, and is set to almost double by 2030 and more than triple by 2050⁵. Establish AD diagnosis needs long and exhaustive cognitive test, completed by neuroimaging examination in order to be differentiated from other causes of dementia: vascular dementia, dementia with Lewis bodies, Parkinson's disease with dementia, frontotemporal dementia and reversible dementias. The neuropathological hallmarks of AD include extracellular plaques of A β peptide, intracellular neurofibrillary tangles and dystrophic neurites, which constitute the final markers attesting definitively of the disease. These histopathologic lesions are restricted to selective brain regions involved in memory and language, i.e. the hippocampus and the cortex⁶. The progressive aggregation of A β peptides into plaque structures is one of the critical events leading to the progressive dismantling of synapses, neuronal circuits and networks⁷⁻⁹, and to neurodegeneration^{10,11}. Interestingly, the appearance of amyloid plaques occurs years before the appearance of cognitive symptoms^{12,13} and is considered to be the distinct hallmark of early onset of the disease activating the sequential lesion events. Therefore, the *in vivo* detection and quantification of amyloid species within the brain of patients at risk constitutes a promising strategy for the early diagnosis and treatment of Alzheimer's disease.

Currently, magnetic resonance imaging (MRI) is the preferred neuroimaging examination for AD as it allows an accurate measurement of brain structures' volume, although a decrease of this latter appears to be a nonspecific and late feature of cerebral vascular diseases' progression¹⁴. Thus, studies are under way to develop specific imaging markers for different types of dementia, including markers of senile plaques for very-high-field MRI and positron emission tomography (PET)¹⁵. A better characterization of the amyloid plaque presence and load in the brain can be also expected from imaging approaches using amyloid ligands as imaging agents¹⁶. One of the most extensively used is the Pittsburgh Compound B (PIB, [¹¹C]2-(4'-methylaminophenyl)-6-hydroxybenzothiazole), which binds with high affinity to any amyloid fibrils¹⁷⁻²¹ and displays a PET signal *in vivo*, and correlates

strongly with the amyloid burden²⁰. Although several PET probes are currently under clinical investigation, and preliminary results indicate that these tracers cannot differentiate between amyloid plaques at various stages and of different nature^{17,19-23}. Indeed, irrespective of the neurodegenerative disease investigated, none of these studies have mapped A β pathologies in sufficient details to allow a quantitative correlation between the PET signal and the amyloid burden in different regions of the brain. Thus, novel non-invasive A β binding substances suitable for *in vivo* imaging, with high protein specificity and detection sensitivity, need to be elaborated.

The development of multifunctional nanoparticles represents a breakthrough in medical imaging since these nanoobjects can meet the requirements of several imaging techniques such as MRI, optical imaging or single photon emission CT (SPECT) / PET scintigraphy while offering excellent resolution and sensitivity. For instance, functionalization of such nanoparticles with specific biovectors allows their active targeting to tumors leading to a more accurate diagnosis²⁴. Likewise, small A β peptides were coupled to gold nanoparticles in order to inhibit A β fibrillogenesis²⁵ or to ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles in order to design contrast agents for A β plaque MRI imaging²⁶.

Recently, sub-5nm gadolinium-based nanoparticles^{27,28} (AGuIX) have been developed that are suitable for multimodal detection: (i) in MRI, DOTAGa(Gd³⁺)-grafted AGuIX nanoparticles led to significantly higher positive contrast when compared to classical molecular agents such as DOTAREM^{®27,29,30}; (ii) SPECT/PET can be carried out following radiolabeling; and (iii) *in vivo* near infrared fluorescence imaging can be performed following the grafting of an appropriate fluorophore. Such multimodal imaging platform, gathering multi-detection possibilities, allows achieving, *in vivo*, a sensitive and reliable imaging. Furthermore, their functionalization with RGD peptides was realized in order to target and detect tumors^{30,31}. Due to their small size and biodegradability, AGuIX are efficiently eliminated from the body through renal clearance with no evidence of toxicity³².

With the aim to develop a sensitive imaging tool which target amyloid fibrils and able to discriminate between different protein amyloid aggregates, we have focused on A β (1-42) fibrils as a proof of concept for amyloidosis. To this end, AGuIX nanoparticles were grafted with two small peptides derived from the sequence of A β (1-42). The peptide KLVFF (corresponding to the hydrophobic core short A β (16-20) fragment) which is crucial for the formation of the β -sheet structures^{33,34} and binds to the full-length A β peptide via atypical antiparallel β -sheet motif^{35,36}, and the peptide LPFFD which binds to the central hydrophobic region of A β ³⁷. The rationale behind our investigation is that thanks to their capacity to co-aggregate with A β (1-42), KLVFF and LPFFD grafted on AGuIX are expected to

target specifically the fibril ends of A β (1-42) deposits (Figure 1B), their interaction is reported by fluorescence detection of a near infrared fluorophore (Cyanine 5.5) also chemically grafted on AGuIX.

.

RESULTS AND DISCUSSION

In this work, we have optimized the functionalization of AGuIX nanoparticles with peptides in order to selectively target A β (1-42) fibrils and detect amyloid plaque in AD animal tissue. AGuIX synthesis were firstly modified and optimized by addition of a PEG chain for LPFFD and KLVFF grafting optimization, the two selected A β (1-42) pentapeptides. Then, AGuIX@PEG@LPFFD and AGuIX@PEG@KLVFF were labeled with the near infrared fluorescent compound cyanine 5.5,

allowing *in vitro* and *ex vivo* experiments. The binding specificity was tested using amyloid fibril: (i) A β amyloid (1-42) fibrils, implicated into plaque amyloid burden in AD, and (ii) Val->30->Met mutated transthyretin (V30M-TTR) fibrils^{38,39}, one of the more than 80 identified mutations on TTR as causative gene abnormality in FAP⁴⁰. The efficiency of the selective interaction was also compared with the PIB-binding to each amyloid fibril. Finally, the specificity of recognition of A β grafted nanoparticles was achieved by immunohistochemistry experiments on brain sections of Alzheimer's disease mouse model.

NANOPARTICLES FUNCTIONALIZATION WITH TARGETING PEPTIDES

AGuIX nanoparticles (Nps) were synthesized by an original top-down process as previously described²⁹. This synthesis led to the formation of Nps displaying a hydrodynamic diameter of $2.7 \pm$

0.7 nm and an average molecular weight of 8.5 ± 1.0 kDa as judged by DLS and HPLC respectively (Figures S1). The skeleton of the nanoparticles is composed of a polysiloxane network containing free amino functions obtained by the use of APTES ((3-Amino)propyltriethoxy silane) precursor during sol/gel process. The primary amine of APTES allows covalent grafting of about ten DOTAGa (Gd³⁺) chelates per particle through amide bond formation resulting from the reaction of the amines with the anhydride function. Small chains of polyethylene glycol diacid (PEG) were added to nanoparticles with one end to be grafted covalently to the nanoparticle, the other remaining available for peptide coupling (Supporting Information Figure S1-A). The nanoparticles surface modification was monitored and characterized by complementary techniques, including Fourier

Transform Infrared spectroscopy (FTIR) and measurement of the ζ -potential (Supporting Information Figure S1-B and S2). Altogether, the results clearly indicated that PEG chains have been grafted to the

nanoparticles, leading to about 5 carboxylic acid functions per Np. Therefore, these AGuIX@PEG are suitable for peptides coupling (Supporting Information, Figure S3).

KLVFF and LPFFD were grafted to nanoparticles by amide formation thanks to classical carbodiimide chemistry between their N-terminal and the carboxylic acid function of the AGuIX@PEG (Figure S3). Dynamic light scattering measurement (Figure 2A) showed a slight increase of the Nps hydrodynamic diameter after peptide grafting: 3.2 ± 0.8 nm for the AGuIX@PEG@LPFFD and 3.5 ± 0.9 nm for the AGuIX@PEG@KLVFF compared to 2.9 ± 0.9 nm for the AGuIX@PEG. The shifts observed in relaxometry (Table 1), HPLC (supporting Information, Figure S4), and granulometry (Figure 2A) are also in accordance with an efficient grafting of the peptides on AGuIX@PEG. The number of A β -peptides grafted to the nanoparticles was evaluated by far UV-circular dichroism at 1.6 ± 0.2 LPFFD-peptide per AGuIX@PEG and 2.25 ± 0.1 KLVFF-peptide per AGuIX@PEG (Figure 2B). In parallel, elementary analyses were performed on the vectorized nanoparticles and confirmed the presence of about 2 peptides per nanoparticle (Supporting Information, Table S1 & S2). These findings were validated by the quantification of free amine in the nanoparticles using the trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) method⁴¹ (Supporting Information, Figure S5, Table S3).

The quality of both AGuIX@PEG@LPFFD and AGuIX@PEG@KLVFF as MRI contrast agent was verified according to their relaxivity values. Both longitudinal (r_1) and transversal (r_2) relaxivities increased after peptide grafting. These high values are due to the important molecular weight of the Nps and to the rigidity induced by the Nps skeleton, leading to an increase of the

rotation correlation time^{42,43}. Thus, the AGuIX@PEG showed a $r_1=12.0 \text{ s}^{-1}.\text{mM}^{-1}$ and $r_2= 18.7\text{s}^{-1}.\text{mM}^{-1}$, when these values rose for the AGuIX@PEG@LPFFD ($r_1=13.2 \text{ s}^{-1}.\text{mM}^{-1}$ & $r_2= 20.1 \text{ s}^{-1}.\text{mM}^{-1}$) and for the AGuIX@PEG@KLVFF ($r_1=14.1 \text{ s}^{-1}.\text{mM}^{-1}$ & $r_2=23.0 \text{ s}^{-1}.\text{mM}^{-1}$). The r_2/r_1 ratios tend to one (Table 1). These values are significantly higher than those of the molecular contrast agents (DOTAREM®: $r_1=3.4$ & $r_2=4.8 \text{ s}^{-1}.\text{mM}^{-1}$ at 60 MHz) confirming the MRI positive contrast imaging feature of AGuIX nanoparticles⁴⁴ (Table 1). These measures indicated that the two distinct nanoparticles grafted with specific Abeta peptide have been obtained while maintaining appropriate MRI characteristics.

Cyanine 5.5 was chosen as dye-label for AGuIX@PEG@LPFFD and AGuIX@PEG@KLVFF, to allow biophysics and *ex-vivo* experiments due to absorption and emission wavelengths in the near infrared ($\lambda_{\text{abs,max}}=675$ nm and $\lambda_{\text{em,max}}=695$ nm). The grafting yield was estimated by comparing the Cy5.5 fluorescence intensity before and after purification and led to an amount of 1 dye for 170 Np and 1 dye for 200 Np for AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5 and AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5 respectively (Supporting Information, Figure S6 & Table S4).

In order to envisage these functionalized nanoparticles as a safety contrast agent for a translation to *in vivo*, especially following the addition of small peptides which could introduce cytotoxicity changes of the nanoparticles⁴⁵, innocuousness of functionalized nanoparticles has been assessed against neuronal cells. Cytotoxicity assays were performed using the viability test of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) on SH-SY5Y, and the results showed that AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5, AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5 and AGuIX@PEG, do not

exhibit any toxic effects on cells (Supporting Information, Figure S7). Indeed, more than 80% of cells were alive after one hour of incubation in the presence of nanoparticles corresponding to Gd^{3+} concentrations between 0.5 mM and 2 mM in Gd^{3+} . It is also interesting to note that even at higher concentration (5 mM Gd^{3+}) more than 75% of cells were still alive. Previous biocompatibilities assays showed no adverse effects upon systemic AGuIX administration in healthy rodent³² and those bearing melanoma, carcinoma⁴⁶ or gliosarcoma⁴⁷, and biodistribution studies indicated their renal excretion within few hours³².

AB PEPTIDE GRAFTED TO AGuIX TARGET SPECIFICALLY A β (1-42) FIBRILS

Formation of amyloid fibrils were obtained by incubation of A β (1-42) peptide and V30M-TTR protein under conditions favorable to aggregation in 3 and 10 days respectively. The final state of amyloid-fibril formation is controlled by transmission electron microscopy as illustrated on Figure 1 C and D: A β (1-42) fibrils are at least 2 μ m long with a wide of 10-15 nm (Figure 1C), whereas the V30M-TTR amyloid fibrils form bundles of about several μ m long and 20 nm wide (Figure 1D).

In order to define an amyloid interaction “gold” standard, K_d values were evaluated using the PIB marker with A β (1-42) and V30M-TTR fibrils by partition experiments. Following incubation of PIB with A β (1-42) or V30M-TTR fibrils, a first measure of the total fluorescence present in the mixture was realized as the total amount of PIB (Figure 3A, dashed line). Then after centrifugation of the mixture, the PIB fluorescence signal associated to the pellet was measured (Figure 3A double line), indicating thereof the PIB bound to the fibrils. Similar measure was performed with the supernatant allowing the evaluation of the unbound fluorescence (Figure 3A, solid line). Experiments were performed with a range of concentrations of PIB (0.01 to 4 μ M) and the results of fluorescent measurements associated with A β (1-42) (Figure 3B) and V30M-TTR (Figure 3C) fibrils were plotted. The fit of the experimental data with the Michaelis binding model (1:1) displayed K_d values equal to 6 μ M for A β (1-42) fibrils (Figure 3 B) and 10 μ M for V30M-TTR fibrils (Figure 3C). These observations

confirm that PIB binds different types of amyloid fibrils making it a general amyloid marker without protein discrimination (Figure 3 B and C). Similar experiments were then performed with AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5 and AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5, on A β (1-42) fibrils, by measuring the related-Cy5.5 fluorescence. For both nanoparticles, no fluorescence has been detected associated with fibrils (data not shown). Although partition method was adapted for the evaluation of the interaction of PIB marker with fibrils, these latter results indicate that the amyloid fibrils interaction-tests, with both functionalized nanoparticles, displayed certainly a lower detection sensitivity.

Therefore the ability of AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5 and of AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5 to target amyloid fibrils was tested using Surface Plasmon Resonance (SPR). This technique allows the observation of interaction in real-time on a sensor chip functionalized with 800 Resonance Unit (R.U.) of V30M-TTR fibrils or 1200 R.U. of A β (1-42) fibrils.

As KLVFF and LPFFD were described to interact with monomer forms of A β ^{37,48}, we ensured first that they interact with A β (1-42) fibrils. Then SPR experiments were carried out with peptide alone, to determine their affinity onto A β (1-42) fibrils (Figure 4.A and 4.B). These results indicate that both selected peptides recognize and interact with A β (1-42) fibrils. The K_d calculated with the Biaevaluation® software were 393 \pm 23 μ M for KLVFF and 317 \pm 48 μ M for LPFFD.

Thereafter, to insure that the pegylation step of the Nps and the cyanine dye grafting did not induced unexpected binding, the number of R.U. remaining 141 seconds after the end of the nanoparticles injection was compared to those obtained with AGuIX@PEG, AGuIX@PEG@Cy5.5,

AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5 and AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5 at 2,5 mM in Gd³⁺ on A β (1-42) fibrils. As illustrated by histograms in figure 5.A, while both AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5 and AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5 interact with A β (1-42) fibrils, AGuIX@PEG and AGuIX@PEG@Cy5.5 do not interact with amyloid fibrils.

Then, similar SPR experiments carried out with a range of nanoparticles concentrations (from 0.02 mM up to 6.4 mM expressed in peptide concentrations) showed that both AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5 (Figure 5.B1) and AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5 (Figure 5.B2) interact with A β (1-42) fibrils. The sensorgrams obtained were fitted with the Biaevaluation® software (Langmuir 1:1). Each experiment was repeated three times and led to the dissociations constants in the range of 534 \pm 134 μ M for AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5 and of 261 \pm 59 μ M for

AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5. Although the K_d values are of several of hundred μM , these results demonstrate that the capacity of KLVFF and LPFFD to bind A β (1-42) fibrils is conserved after their grafting on AGuIX, with affinity of the same order of magnitude than those obtain with free peptides. The specificity of these interactions for A β (1-42) fibrils was assessed in the same range of concentration of nanoparticles on a chip coated with V30M-TTR fibrils. As illustrated on figure 5C, 141 seconds after the end of nanoparticles injection, whereas both AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5 and AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5 displayed an interaction on A β (1-42) fibrils (blue curves) dependent on nanoparticle concentrations injected, no specific interaction of any functionalized nanoparticles was recorded on V30M-TTR fibrils (red curves). This confirms the discriminatory feature of AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5 and AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5 for A β (1-42) fibrils, supporting that the interactions between AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5 and AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5 with A β (142) fibrils are indeed mediated by the targeting peptides KLVFF and LPFFD.

Altogether, these *in vitro* experiments demonstrate that AGuIX nanoparticles functionalized with LPFFD or KLVFF, are able to bind and to discriminate A β (1-42) amyloid fibrils. Interestingly, it can be noticed that the grafting step of peptides on nanoparticles does not drastically modify the affinity of both peptide for the targeted fibrils.

VECTORIZED-NANOPARTICLES RECOGNIZE A β PLAQUES IN AD MICE BRAIN

As next step, the ability of both AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5 and AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5 to detect A β amyloid plaques into the brain of Alzheimer's disease animal model was tested. For this purpose, immunohistochemical experiments were performed on A β PPswe/PS1A246E/TTR(-/-) transgenic mouse brain sections. Such 10 months old transgenic mice display amyloid plaques in the cortex and the hippocampus⁴⁹. Similar experiments were performed on control animals of A β PPswe/PS1A246E/TTR(+/-), which do not contain amyloid deposits in the cortex and the hippocampus⁴⁹ (Figure 6 B and D). AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5 or AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5 was incubated on brain sections with or without amyloid deposits and visualized, owing to the grafted-Cy5.5 fluorescence by optic microscopy in the near infrared, while cellular nucleus were located using Hoechst dye.

As illustrated on Figure 6, strong Cy5.5 fluorescence was visualized in AD brain sections, in specific structure (zoomed in a square figure 6 A and C), with a core surrounded by diffuse fluorescence and

by dots. These observations are characteristic of AD lesions constituted by amyloid plaque with cored and diffused deposits and dystrophic neurites in the vicinity of the plaque⁵⁰. These structures are mainly constituted by A β (1-42) peptide into fibrillar β -sheet structure⁵¹. Similar experiments, on control brain sections without amyloid plaques, did not display such fluorescent staining as visualized in Figure 6 B and D.

The specificity of functionalized nanoparticles binding was verified, by incubating nanoparticles without grafted-peptides, AGuIX@PEG@Cy5.5, on brain section containing amyloid burden. As expected, no amyloid plaque was stained by Cy5.5 fluorescence in hippocampus region (Figure 6E). Although, some yellow dots were noticeable on the vessels and in the CA3 cell layer of the hippocampus and control immunostaining experiments with Cy5.5 alone indicated this staining constitutes a background due to the Cy5.5 restricted to blood vessels (Supporting Information, Figure S9). Whereas, various other cyanine derivative dyes⁵² can bind amyloid fibrils, the Cy5.5 molecule does not stain fibrils as observed *in vitro* on fibrils (personal data) and on brain section of AD mouse model⁵³.

The selectivity of AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5 and AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5 for A β (1-42) amyloid deposits was also assessed using a nanoparticle grafted with a peptide non related to A β (1-42) fibrils, AGuIX@PEG@TTR-peptide@Cy5.5. Immunohistochemistry performed on AD brain sections with this non related A β -peptide grafted nanoparticle, showed a low background related to cyanine5.5 fluorescence (Figure 6 F).

The A β burden of AD mouse model was evaluated using PIB for immunohistochemical staining as fluorescent ligand on AD brain. Figure 6G resulted from the merge of both staining and revealed robust fluorescent dots with diffusing labeling localized in AD mouse hippocampus (see in zoom square Figure 6G). Such picture could be correlated with compact/cored amyloid plaque⁵⁴ and diffuse plaques⁵²

Altogether, these results indicated that both AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5 and AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5, bind selectively amyloid plaque constituted by A β protein on *ex vivo* AD mouse hippocampus.

CONCLUSION

In this work, ultra-small gadolinium-nanoparticles were successfully grafted with two peptides targeting A β (1-42) fibrils (KLVFF and LPFFD). Although these peptides are described as β breakers due

to their ability to interact with A β monomer and to inhibit the formation of amyloid oligomers⁵⁶ and fibrils^{36,55,56}, they were shown to selectively interact with A β (1-42) amyloid fibrils as well. The binding affinity of the grafted peptide for A β (1-42) fibrils is in the range of the hundredth of μ M, this remaining compatible with the injected dose usually used in clinical MRI applications and particularly for diagnosis. Histological examination of the nanoparticles proved their ability to preferentially interact with amyloid plaques present in the brain of AD mouse model confirming their targeting potential. The selective interaction of the functionalized nanoparticles with A β (1-42) fibrils was confirmed by the lack of affinity for V30M-TTR fibrils, amyloid fibrils implicated in FAP, another type of amyloidosis.

Characterization of these new nanoparticles confirms that they possess several of the features needed for biomedical neuroimaging: relaxivity's measures showed that functionalized AGuIX conserve high positif MRI contrast allowing MRI signal enhancement, facilitating image interpretation⁵⁷; the absence of AGuIX accumulation in certain organs³², such as the liver or spleen, and their rapid renal elimination allow their consideration for *in vivo* injection, as it's well known that this such phenomena may constitute a limit to the use of certain contrast agents, as reported for iron oxide nanoparticles⁵⁸, where their long lasting presence can be associated with cellular cytotoxic effects^{59,60}.

Besides the high MRI contrast of AGuIX, due to their enrichment in gadolinium chelates, these nanoparticles can be formulated to create a multimodal imaging platform, and/or by coupling ⁶⁸Ga derivatives for PET detection⁶¹ and for instance by covalently grafting a near infrared fluorophore for small animal. In conclusion, the ability of targeting and typing amyloid fibrils, by these new multifunctional nanoparticles, constitutes a first step of a promise and powerful strategy for a reliable early detection and identification of amyloidoses. Their future development will constitute a diagnostic and theranostic tool for the monitoring of the disease progression and the biochemical effects of drugs.

MATERIAL AND METHODS

CHEMICALS

N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC, >98.0%), N-hydroxysuccinimide (NHS, >97.0%), gadolinium chloride hexahydrate ($[\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$, 99%), sodium hydroxide (NaOH, 99.99%), hydrochloric acid (HCl, 36.5–38%), sodium chloride (NaCl, >99.5%), dimethyl sulfoxide (DMSO, >99.5%), acetonitrile (CH_3CN , >99.9%), trifluoroacetic acid (TFA, >99%), trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) 1 M in water, sodium dodecyl sulfate (SDS, >99%), (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES, >98%), tetraethyl orthosilicate (TEOS; >98%) and Poly(ethylene glycol) bis(carboxymethyl) ether (PEG) with an average molecular weight $M_n = 250 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ were purchased from Aldrich Chemical (France) and used without further purification. Diethylene glycol (DEG, 99%) was purchased from SDS Carlo Erba (France). Acetone (reagent grade) was purchased from Sodipro (France) and was used as received. Freeze-dried full peptides

$\text{A}\beta(1-42)$, small $\text{A}\beta$ specific-peptide (LPFFD and KLVFF) (>98%) and small TTR targeter peptide (>98%) were purchased from Genecust (Luxembourg). Recombinant human V30M-TTR protein was obtained following cloning its gene in the plasmid pQE81L and its expression in E Coli (M15). Briefly, bacterial cultures were performed in LB medium, $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ampicillin and $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ kanamycin, at 37°C , under constant orbital shaking. Protein production was pursued for 7 hours after IPTG induction when the OD was 0.700 at 600nm. The bacterial pellet of 50 mL of culture was resuspended in sodium phosphate 50 mM, pH 8, sodium chloride 300 mM, imidazole 10 mM, betamercaptoethanol 10 mM, supplemented with 500 μL of a protease inhibitor,

phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma, # 78830), at 1 mM final and a cocktail of protease inhibitor EDTA-free (Roche, #11873580001). The suspension was sonicated during a total time of 6 min with repeated cycles of 5 s/ 7s off with an amplitude of 20%, then centrifuged during 30 min at 100 000 g, to pellet cellular debris. The supernatant was filtered on 0.2 μm cut off filters. The purification of the protein was performed on immobilized metal ion chromatography (Chelating Fast Flow, Amersham 17057501), and dialyzed against 20 mM NH_4HCO_3 (membrane cutoff 1/10 000; 3500

MWCO Spectrapore). Finally, the protein was freeze-dried. The protein quality was checked by SDS PAGE gel 15%. The Pittsburgh compound-B (PiB) derivative molecule was synthesized according to the procedure already described in the literature⁶². Starting from the p-anisidine, the p-nitrobenzoyl

amide was readily obtained and then the corresponding thioamide was prepared by reaction with Lawesson's reagent. Finally, an oxidative cyclization was done to lead to the benzothiazole derivative, and the nitro function was reduced to give compound (Synthesis' details in Supporting Information).

NANOPARTICLES SYNTHESIS AND FUNCTIONALIZATION

The AGuIX Nps were provided by Nano-H SAS (Saint-Quentin Fallavier, France) and the DOTAGA anhydride (1,4,7,10-tetraazacyclododecane- 1-glutaric anhydride-4-7-10-triacetic acid) was purchased from CheMatech (Dijon, France). AGuIX syntheses were performed at room temperature. Nanoparticles concentrations are stated in mol.L⁻¹ of Gd³⁺. AGuIX were synthesized as previously described²⁹ (See Supporting Information). These Nps are composed of a polysiloxane network which is surrounded by covalently grafted DOTAGa(Gd³⁺) chelate. During the first step, Poly(ethylene glycol) bis(carboxymethyl) ether (PEG) was grafted on AGuIX. The freeze-dried AGuIX nanoparticles were dispersed in water to reach a concentration of Gd³⁺ of 500 mM and then diluted ten times with a solution of diethylene glycol (DEG) at 80°C. In parallel, the carboxylic acid functions of the PEG chains were activated with EDC and NHS coupling reagents (EDC/NHS/PEG molar ratio 10 : 20 : 1). The NHS-ester formation was performed in anhydrous DMSO at 100 mM in PEG under stirring at room temperature for 30 min. Then, the NHS-ester PEG solution was added to the nanoparticles suspension (PEG/Gd molar ratio 3 : 1) and the reaction mixture left for 12 hrs at room temperature. Finally, the Nps were diluted in ultrapure water in order to reach a volume percentage (%v) of DMSO below 5%. Purification of the nanoparticles was performed by tangential flow filtration on a 5 kDa molecular cutoff membrane. This step allows removing the unreacted reagents and the degraded nanoparticles. The AGuIX@PEG nanoparticles were freeze-dried using a Christ Alpha 1-2 lyophilizer until the covalent conjugation of the Aβ amyloid peptides. In a second time, freeze-dried AGuIX@PEG nanoparticles were first dispersed in water to reach a concentration of Gd³⁺ of 500 mM, and then successively diluted ten times with DEG at 80°C and then two times with anhydrous DMSO, leading to final concentration of Gd³⁺ of 25 mM. The carboxylic functions of the NPs were activated by EDC and NHS (EDC/NHS/Gd molar ratio 10 : 20 : 1) under stirring at room temperature for 30 min. The activated Nps suspension was divided into two aliquots: one to be grafted with each of the two Aβ specific peptides. Each peptide, dissolved at 100 mg.mL⁻¹ in anhydrous DMSO, was added to the Nps suspension and stirred for 12 hrs at room temperature. The nanoparticles were then diluted in ultrapure water in order to reach a concentration in DMSO below 5%v and purified by tangential filtration on a 5 kDa molecular cutoff membrane. This step allows removing the EDC/NHS activators, the unreacted peptides and the degraded nanoparticles. The suspension of purified

AGuIX@PEG@Peptide nanoparticles was set at 100 mM of Gd^{3+} in ultrapure water and the pH was adjusted to 7. Finally, AGuIX@PEG@Peptide Nps were grafted with the fluorophore, Cyanine 5.5 NHS, which was dissolved in anhydrous DMSO at 2.5 mg.mL^{-1} . This mixture was slowly added to the nanoparticles suspension (Cy5.5/Gd molar ratio 1: 1000). After 4 hrs of reaction, the mixture was purified by tangential filtration with a Vivaspin® tube with a cutoff of 5 kDa in order to remove the ungrafted cyanine molecules, the NHS formed and the degraded particles. Finally the nanoparticles AGuIX@PEG@Peptide@Cy5.5 were freeze-dried for storage using a Christ Alpha 1-2 lyophilizer. They are stable for months without alteration at room temperature.

RELAXIVITY MEASUREMENTS

Relaxivity measurements were performed on a Bruker® minispec mq60NMR analyzer (Bruker, USA) at 37°C at 1.4 T (60 MHz). Samples were measured at a specific Gd^{3+} concentration (mM), calculated from ICP-OES. The longitudinal relaxation time T_1 and the transverse relaxation time T_2 (s) were measured at 60 MHz and at 37°C . Then the relaxivities r_i ($\text{s}^{-1}.\text{mM}^{-1}$) were obtained according to the following formula:

$$\left(\frac{1}{T_i}\right)_{measured} = \left(\frac{1}{T_i}\right)_{water} + r_i[Gd^{3+}]$$

where $i = 1$ or 2 .

DYNAMIC LIGHT SCATTERING (DLS)

Hydrodynamic diameters (D_H) of the Nps were determined with a Zetasizer NanoS (laser He-Ne 532 nm) from Malvern Instrument® (5 mW, with 173° NIBS detector and narrow band filter). Attenuator was optimized by the device and position was set to the center of the cell. To perform the measurement, 1 mL of nanoparticles suspensions at 10 mM Gd^{3+} was poured in a 12 mm square polystyrene disposable cuvette after filtration on a $0.2 \mu\text{m}$ cut-off nylon filter. Each measurement was repeated 8 times.

HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

Gradient HPLC analysis was carried out using the Shimadzu® Prominence series UFLC system equipped with a CBM-20A controller bus module, an LC-20AD liquid chromatograph, a CTO-20A column oven, a SPD-20A UV-Visible detector allowing absorption measurement at two chosen wavelengths and a RF-20A fluorescence detector allowing fluorescence measurements at specific excitation and emission wavelengths. For all measurements, the UV-visible detectors were set respectively at 295 nm and 350 nm. Sample aliquots of 20 µL were injected in a 95% solvent A – 5% solvent B (A=Milli-Q water/TFA 99.9:0.1 v/v; B=CH₃CN/Milli-Q water/TFA 90 : 9.9 : 0,1 v/v/v) into a Jupiter C4 column (150 x 4,60 mm, 5 µm, 300 Å, Phenomenex®) at a flow rate of 1 mL.min⁻¹ over 5 min. In a second step, samples were eluted by a gradient from 5% to 90% of solvent B in solvent A over 15 min. Finally, the concentration of solvent B was maintained over 5 min. Then, the concentration of solvent B was decreased to 5% over a period of 5 min to re-equilibrate the system, followed by additional 5 min at this final concentration. Before each sample measurement, a baseline was recorded following the same conditions by loading Milli-Q water onto the injection loop.

INDUCTIVELY COUPLED PLASMA-OPTICAL EMISSION SPECTROSCOPY (ICP-OES) ANALYSIS

Determination of the gadolinium content in a sample was performed by ICP-OES analysis with a Varian 710-ES spectrometer. Before measuring Gd³⁺ concentration, samples of colloidal solution were dissolved in HNO₃ 67% at 80 °C for 2 hours. The samples were then diluted 10 folds in HNO₃ 5%. Chemical analysis were also performed on the as-prepared samples at the Service Central d'Analyses du CNRS (Villeurbanne, France) by ICP-MS and enabled determining the C, N, Si contents with a precision of 0.5%.

CIRCULAR DICHROISM

Circular dichroism was used in order to determine the number of Aβ peptide grafted on the nanoparticles. Standard curves of peptide KLVFF and LPFFD are obtained by successive dilutions in distilled water (300 µL), respectively at 25, 50, 100, 200 mg.L⁻¹ and 20, 50, 100, 200, 300 mg.L⁻¹. The freeze-dried nanoparticles were dissolved in distilled water at 5 mM, and diluted in 300 µL of distilled water at 0.03, 0.05 and 0.1 mM. Spectra of each sample were recorded in a 1 mm path length quartz cell on a JASCO J-815 CD spectrometer using a response time of 1 s, a scan speed of

200 nm.min⁻¹ and a bandwidth of 4 nm. Thirty spectra were accumulated and averaged in far UV (200-250 nm) at 20°C and quantification was done at 212 nm (KLVFF) and 219 nm (LPFFD). These wavelengths were selected on each peptide spectrum as the more characteristic point obtained in function of their concentrations. The molar ellipticity reported as a function of the peptide concentration allowed determining the number of peptide per nanoparticles.

BETA-AMYLOID FIBRILS GROWTH

Freeze-dried Aβ1-42 peptide (Genecust) was dissolved in distilled water at pH 11.0. The solution was filtrated through a spin 0.2 μm membrane filter (Millipore, n°146560) to remove any aggregated species. The solution was stored at -20 °C. Aβ(1-42) fibrils were prepared by incubating monomer Aβ(1-42) peptide solution (final concentration at 100 μM) in Tyrode's buffer (150 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM HEPES pH 7.4, 10 mM glucose; pH 6,5) at 37 °C in 500 μL reaction volume on a rotating shaker (300 rpm) for 72 hrs. Fibril morphology formation was confirmed by TEM analysis (JEOL 1200EX).

V30M-TTR AMYLOID FIBRILS GROWTH

The protein V30M-TTR was directly dissolved in buffer A (KH₂PO₄ 10 mM, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, adjusted to pH=7 and filtrated with a spin 0.2 μm) and buffer B (C₂H₃NaO₂ 200 mM, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, adjusted to pH=4,4, filtrated with a spin 0.2 μm), with the same volume of each buffer to obtain a final concentration at 32,3 μM of V30M-TTR protein (pH=4,6) in a 1 mL reaction volume. It was incubated on a rotating shaker (300 rpm) during 10 days at 70°C. Fibril morphology formation was confirmed by TEM analysis.

TRANSMISSION ELECTRONIC MICROSCOPY

Ten μl of Aβ(1-42) or V30M-TTR fibrils samples were adsorbed on to the clean face of a carbon film on mica sheet (carbon/mica interface) and negatively stained with 1% (w/v) uranyl acetate.

Micrographs were recorded at 80 kV using a JEOL 1200EX equipped with a Veleta camera (Olympus) and iTEM software or at 200 kV on a FEI Tecnai™ G2 Sphera.

BINDING ASSAYS

Twenty μM of A β (1-42) or V30M-TTR fibrils were incubated with PIB at 0.01, 0.1, 0.4, 0.8, 1.2, 2 and 4 μM , or 2 μM of AGuIX@PEG@KLVVF@Cy5.5 or AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5, saturated with 3 mM AGuIX, for 60 min at room temperature in 500 μL of each prepared fibril buffer. A first measure of fluorescence was carried out on the mixture, which was then centrifuged for 25 min at 14000 rpm and 25°C to obtain a pellet (containing fibrils) and a supernatant (containing free nanoparticles or PIB). The pellet was dispersed in 500 μL of fibril buffer. A second measure of fluorescence was realized both on the supernatant and the re-suspended pellet. According to the fluorescence properties of PIB ($\lambda_{\text{exc}} = 350\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 420\text{nm}$) or cyanine 5.5 ($\lambda_{\text{exc}} = 600\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 655\text{nm}$) spectrum of each sample was recorded in a 1 cm path length quartz cell on a CD-spectrophotometer (JASCO J815) using a response time of 1 s, a scan speed of 100 nm.min⁻¹, an excitation bandwidth of 5 nm and an emission bandwidth of 10 nm. Three spectra were accumulated at 25°C and averaged. Spectra are treated by subtracting of the spectrum recorded for the buffer. Michaelis binding model was used to determine the dissociation constant (K_D) following the equation: $y = Y_m/(1+(K_D/x))$, where Y_m is the maximum of fluorescence (A.U).

SURFACE PLASMON RESONANCE ASSAYS

The surface plasmon resonance (SPR) assays were performed using a BIAcore® 2000 biosensor. The instrument was equipped with a CM3 sensor chip (GE Healthcare®, Uppsala,

Sweden). The interaction studies took place on a gold chip functionalized with carboxymethylated dextran. The sensor surface itself form one wall of a flow cell, which is an integral part of the microfluidic system. All SPR experiments were performed at 25°C. HEPES buffer (HBS-P, GE Healthcare®, 0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, 0.005% surfactant p20) was used as running buffer.

For immobilization, amine coupling reagents were obtained from the GE Healthcare® kit containing 0.2 M EDC in water, 0.05 M NHS in water and ethanolamine-HCl pH 8.5. Prior immobilization, the size of the A β (1-42) fibrils was reduced using an ultrasonic disruptor Sonoplus HD 2070 (Banderlin, Germany). The sonication was performed on ice at 40 W during 20 s (pulse of 0.6 s; interval of 0.4 s; mode PULS, cycle 6)⁶⁴. A β (1-42) and V30M-TTR fibrils were immobilized on the flow cell 2 and 4 respectively of a CM3 sensor chip with an amine coupling reaction. After the chip activation by EDC/NHS during 7 min, the fibrils were injected at: 10 μM in 10 mM sodium acetate pH 4 at a flow

rate of $5 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ during 20 min for A β (1-42) fibrils or at $0.36 \mu\text{M}$ in 10 mM sodium acetate pH 5.5 at a flow rate of $5 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ during 100 min for V30M-TTR fibrils. The immobilization levels were around 1200 Respond Units (R.U.) for the A β (1-42) fibrils and 800 R.U. for the V30M-TTR fibrils. The flow cell 1 and 3 from this chip were activated by EDC/NHS during 7 min and then deactivated by ethanolamine during 7 min and used as reference surface.

Biacore® experiments gathered data from 3 cycles for each studied analyte. One cycle consisted in the injection of the compound to be tested for 3 min. A waiting period of 2.5 min under running buffer (HBS-P) followed this step. Then the surface was regenerated, using the GE Healthcare® regeneration scouting kit, to remove the analyte from the chip by injection of 2 M NaCl and 5 mM NaOH during 60 s. A stabilization period of 2 min under running buffer finished the cycle. For the kinetic assays, the nanoparticle were injected at the concentration of 0.02; 0.2; 0.4; 0.8; 1.6;

3.2 and 6.4 mM in peptide (corresponding to 0.1; 1; 2; 4; 8; 16 and 32 mM in Gd³⁺) in running buffer (HBS-P) with 10% liquid dextran (Non Specific Binding Reducer, GE Healthcare®) to reduce unspecific interaction. The free peptides were injected at concentrations ranging from 44 to 704 μM . Each experiment began with five cycles injecting running buffer instead of analyte to stabilize the baseline of the apparatus. On the other hand, channel 1 or 3 were maintained in their carboxymethylated dextran native form to serve as a reference and observe possible non-specific interactions. Results of the interaction between the analytes and the A β (1-42) or V30M-TTR fibrils were represented on a sensorgram expressed as respectively FC2-1 or FC4-3 (RU-RUdextran) versus time. The data were processed by Biaevaluation software (Biacore) and fitted using the 1:1 Langmuir binding model to obtain the equilibrium dissociation constant (K_d). The step was performed for each of the three sets of experiments. The value of R.U. obtained 141 s after the end of the injection was compared for the AGuIX@PEG, AGuIX@PEG@Cy5,5, AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5,5 and AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5,5 at 2,5 mM in Gd³⁺ on A β (1-42) fibrils and V30M-TTR fibrils.

ANIMAL MODELS

APPswe/PS1A246E/TTR mouse model was generated in JM Saraiva's lab by crossing APPswe/PS1A246E mice (B6/C3 H background) with TTRnull mice (TTR^{-/-}) (SV129 background)⁶⁵. These transgenic mice co-express a chimeric mouse-human amyloid- protein precursor (APP) bearing a human A domain with mutations (K595 N and M596 L) linked to Swedish (Swe) familial AD (FAD) pedigrees and human presenilin 1 (PS1) bearing a mutation (A246E) which also causes FAD.

Expression of both transgenes is under the control of the mouse prion protein promoter (PrP). Animals used in this work were female APP/PSEN/TTR(-/-) 10 months old, displaying a dramatic amyloid plaques burden. Six months old male APP/PSEN/TTR(+/-), displaying rare plaques and very low levels of detergent- and formic acid-soluble A β 40 and A β 42 proteins in the transgenic male brain⁶⁶ were used as control. Animals were housed in a controlled environment (12-h light/dark cycle; temperature, 22 \pm 2°C; humidity, 45–65%), with food and water freely available. All procedures involving animals were carried out in accordance with the European Communities Council Directive.

IMMUNOHISTOCHEMISTRY AND MICROSCOPY

Mice were deeply anesthetized with a mixture of ketamine and medetomidine. Brains were removed from the skull and bisected longitudinally: each half was fixed for 24 h at 4°C in 10% neutral buffered formalin and then transferred to a 30% sucrose solution for cryoprotection before cryostat sectioning (10 μ m) for immunohistochemical analyses. Sections were mounted on glass slides and allowed to dry at room temperature for a few minutes. They were washed three times in phosphate buffer saline (PBS), and incubated into permeabilization-saturation buffer [PBS 1X, 0.3% triton, 1% bovine serum albumin] for 1h at RT. Then incubation with, AGuIX@PEG@KLTVF@Cy5.5,

AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5, AGuIX@Cy5.5 or AGuIX@PEG@TTR@Cy5.5 nanoparticles at 3 nM of Cy5.5 (corresponding to 2mM Gd³⁺) with, for non-specific saturation, 3 mM ungrafted nanoparticles, or PIB at 1 μ M were incubated on section in the same buffer for 1h30 at RT. For amyloid burden control, sections were directly stained with Thioflavin-S (at 0.05% in EtOH 50%, Sigma, #T1892) according to standard practice. Cell staining was performed using the phalloidin-TRITC (Sigma, #P1951) in the case of slices treated with PIB. After the PBS wash, all the other sections were coverslipped with dabco-mowiol mounting medium with additional Hoechst to stain cell nucleus. Fluorescent images were observed using the proper filter for each marker: cyanine 5.5 : $\lambda_{\text{excitation}}$ =

620nm- $\lambda_{\text{emission}}$ = 642nm, PIB or Hoechst: $\lambda_{\text{excitation}}$ = 350 nm- $\lambda_{\text{emission}}$ = 405nm, phalloidin: $\lambda_{\text{excitation}}$ = 540 nm- $\lambda_{\text{emission}}$ = 570nm and Thioflavin-S: $\lambda_{\text{excitation}}$ = 450 nm- $\lambda_{\text{emission}}$ = 488 nm using a Zeiss microscope Axiovert 200M. Images were analyzed using Carl Zeiss AxioVision software.

Supporting information available: This material is available free of charge via internet at <http://pubs.acs.org>.

Peptide-grafted nanoparticles synthesis' steps and their characterization during the different states of the process; Lack of toxicity of functionalized nanoparticles towards neural cells; Synthesis of the Compound Pittsburgh B; Cyanine 5.5 immunohistochemistry staining on the brain section of the Alzheimer's disease animal model.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Pr. X. Montet for helpful discussion on the nanoparticles development for medical imaging. TEM images were obtained at the electronic microscopy platform, Neurosciences Institute of Grenoble, 38700 La Tronche. M.Dumoulin is a research associate from FRS-FNRS

REFERENCES

1. T. P. Knowles, M. Vendruscolo and C. M. Dobson, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15, 384-396.
2. F. Chiti and C. M. Dobson, *Annu Rev Biochem*, 2006, 75, 333-366.
3. M. Ueda and Y. Ando, *Transl Neurodegener*, 2014, 3, 19.
4. R. J. Perrin, A. M. Fagan and D. M. Holtzman, *Nature*, 2009, 461, 916-922.
5. *World Alzheimer Report*, 2014.
6. I. L. Ferreira, R. Resende, E. Ferreira, A. C. Rego and C. F. Pereira, *Curr Drug Targets*, 2010, 11, 1193-1206.
7. A. Y. Hsia, E. Masliah, L. McConlogue, G. Q. Yu, G. Tatsuno, K. Hu, D. Kholodenko, R. C. Malenka, R. A. Nicoll and L. Mucke, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96, 3228-3233.
8. P. F. Chapman, G. L. White, M. W. Jones, D. Cooper-Blacketer, V. J. Marshall, M. Irizarry, L. Younkin, M. A. Good, T. V. Bliss, B. T. Hyman, S. G. Younkin and K. K. Hsiao, *Nat Neurosci*, 1999, 2, 271276.
9. D. M. Walsh, I. Klyubin, J. V. Fadeeva, W. K. Cullen, R. Anwyl, M. S. Wolfe, M. J. Rowan and D. J. Selkoe, *Nature*, 2002, 416, 535-539.
10. J. A. Hardy and G. A. Higgins, *Science*, 1992, 256, 184-185.
11. D. J. Selkoe, *Neuron*, 1991, 6, 487-498.
12. H. Braak and E. Braak, *Neurobiol Aging*, 1997, 18, 351-357.
13. D. R. Thal, U. Rub, M. Orantes and H. Braak, *Neurology*, 2002, 58, 1791-1800.
14. G. B. Frisoni, M. P. Laakso, A. Beltramello, C. Geroldi, A. Bianchetti, H. Soininen and M. Trabucchi, *Neurology*, 1999, 52, 91-100.
15. G. McKhann, D. Drachman, M. Folstein, R. Katzman, D. Price and E. M. Stadlan, *Neurology*, 1984, 34, 939-944.
16. A. Nordberg, *Neurodegener Dis*, 2010, 7, 136-138.

17. A. Coimbra, D. S. Williams and E. D. Hostetler, *Curr Top Med Chem*, 2006, 6, 629-647.
18. L. Mosconi, V. Berti, L. Glodzik, A. Pupi, S. De Santi and M. J. de Leon, *J Alzheimers Dis*, 2010, 20, 843-854.
19. R. Mistur, L. Mosconi, S. D. Santi, M. Guzman, Y. Li, W. Tsui and M. J. de Leon, *J Clin Neurol*, 2009, 5, 153-166.
20. G. D. Rabinovici and W. J. Jagust, *Behav Neurol*, 2009, 21, 117-128.
21. E. Hellstrom-Lindahl, P. Westermarck, G. Antoni and S. Estrada, *Amyloid*, 2014, 21, 21-27.
22. A. Kadir, A. Marutle, D. Gonzalez, M. Scholl, O. Almkvist, M. Mousavi, T. Mustafiz, T. DarrehShori, I. Nennesmo and A. Nordberg, *Brain*, 2011, 134, 301-317.
23. K. Kantarci, C. Yang, J. A. Schneider, M. L. Senjem, D. A. Reyes, V. J. Lowe, L. L. Barnes, N. T. Aggarwal, D. A. Bennett, G. E. Smith, R. C. Petersen, C. R. Jack, Jr. and B. F. Boeve, *Neurobiol Aging*, 2012, 33, 878-885.
24. G. Bao, S. Mitragotri and S. Tong, *Annu Rev Biomed Eng*, 2013, 15, 253-282.
25. N. Gao, H. Sun, K. Dong, J. Ren and X. Qu, *Chemistry*, 2015, 21, 829-835.
26. L. Larbanoix, C. Burtea, S. Laurent, F. Van Leuven, G. Toubreau, L. Vander Elst and R. N. Muller, *Neurobiol Aging*, 2010, 31, 1679-1689.
27. F. Lux, A. Mignot, P. Mowat, C. Louis, S. Dufort, C. Bernhard, F. Denat, F. Boschetti, C. Brunet, R. Antoine, P. Dugourd, S. Laurent, L. Vander Elst, R. Muller, L. Sancey, V. Josserand, J. L. Coll, V. Stupar, E. Barbier, C. Remy, A. Broisat, C. Ghezzi, G. Le Duc, S. Roux, P. Perriat and O. Tillement, *Angew Chem Int Ed Engl*, 2011, 50, 12299-12303.
28. A. Mignot, C. Truillet, F. Lux, L. Sancey, C. Louis, F. Denat, F. Boschetti, L. Bocher, A. Gloter, O. Stephan, R. Antoine, P. Dugourd, D. Luneau, G. Novitchi, L. C. Figueiredo, P. C. de Moraes, L. Bonneviot, B.

Albela, F. Ribot, L. Van Lokeren, I. Dechamps-Olivier, F. Chuburu, G. Lemerrier, C. Villiers, P. N.

Marche, G. Le Duc, S. Roux, O. Tillement and P. Perriat, *Chemistry*, 2013, 19, 6122-6136.

29. G. Le Duc, S. Roux, A. Paruta-Tuarez, S. Dufort, E. Brauer, A. Marais, C. Truillet, L. Sancey, P.

Perriat, F. Lux and O. Tillement, *Cancer Nanotechnol*, 2014, 5, 4.

30. A. Bianchi, D. Moncelet, F. Lux, M. Plissonneau, S. Rizzitelli, E. J. Ribot, N. Tassali, V. Bouchaud, O.

Tillement, P. Voisin and Y. Cremillieux, *NMR Biomed*, 2015, 28, 738-746.

31. J. Morlieras, J. M. Chezal, E. Miot-Noirault, A. Vidal, S. Besse, D. Kryza, C. Truillet, A. Mignot, R. Antoine, P. Dugourd, F. Redini, L. Sancey, F. Lux, P. Perriat, M. Janier and O. Tillement, *Chem Commun (Camb)*, 2013, 49, 3046-3048.

32. L. Sancey, S. Kotb, C. Truillet, F. Appaix, A. Marais, E. Thomas, B. van der Sanden, J. P. Klein, B. Laurent, M. Cottier, R. Antoine, P. Dugourd, G. Panczer, F. Lux, P. Perriat, V. Motto-Ros and O. Tillement,

ACS Nano, 2015.

33. T. L. Lowe, A. Strzelec, L. L. Kiessling and R. M. Murphy, *Biochemistry*, 2001, 40, 7882-7889.

34. C. Hilbich, B. Kisters-Woike, J. Reed, C. L. Masters and K. Beyreuther, *J Mol Biol*, 1992, 228, 460473.

35. C. Soto, M. S. Kindy, M. Baumann and B. Frangione, *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 226, 672-680.

36. C. Soto, E. M. Sigurdsson, L. Morelli, R. A. Kumar, E. M. Castano and B. Frangione, *Nat Med*, 1998, 4, 822-826.

37. L. O. Tjernberg, J. Naslund, F. Lindqvist, J. Johansson, A. R. Karlstrom, J. Thyberg, L. Terenius and C. Nordstedt, *J Biol Chem*, 1996, 271, 8545-8548.

38. K. Tojo, Y. Sekijima, J. W. Kelly and S. Ikeda, *Neurosci Res*, 2006, 56, 441-449.

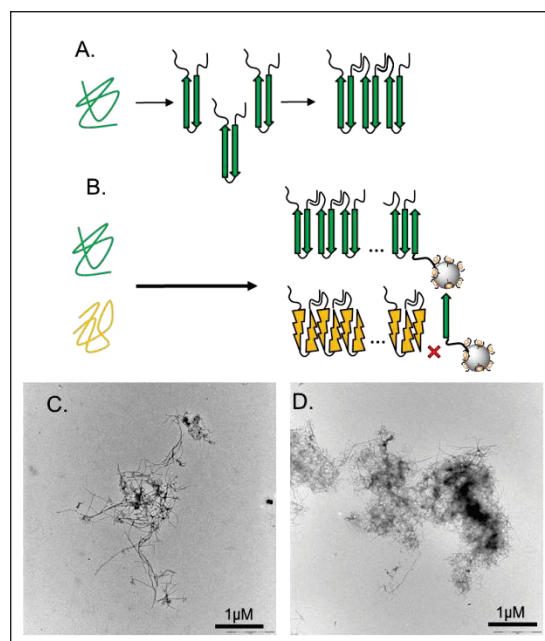
39. H. A. Lashuel, Z. Lai and J. W. Kelly, *Biochemistry*, 1998, 37, 17851-17864.

40. S. Ikeda, M. Nakazato, Y. Ando and G. Sobue, *Neurology*, 2002, 58, 1001-1007.

41. R. B. Sashidhar, A. K. Capoor and D. Ramana, *J Immunol Methods*, 1994, 167, 121-127.
42. L. Helm, A. Merbach and E. Toth, *The chemistry of contrast agents in medical magnetic resonance imaging*, John Wiley and Sons Inc: Hoboken, NJ edn., 2013.
43. R. B. Lauffer, *Chemical Reviews*, 1987, 87, 901-927.
44. N. Xiao, W. Gu, H. Wang, Y. L. Deng, X. Shi and L. Ye, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2014, 417, 159-165.
45. N. Xiong, X. Y. Dong, J. Zheng, F. F. Liu and Y. Sun, *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7, 5650-5662.
46. L. Sancey, F. Lux, S. Kotb, S. Roux, S. Dufort, A. Bianchi, Y. Cremillieux, P. Fries, J. L. Coll, C. Rodriguez-Lafrasse, M. Janier, M. Dutreix, M. Barberi-Heyob, F. Boschetti, F. Denat, C. Louis, E. Porcel, S. Lacombe, G. Le Duc, E. Deutsch, J. L. Perfettini, A. Detappe, C. Verry, R. Berbeco, K. T. Butterworth, S. J. McMahon, K. M. Prise, P. Perriat and O. Tillement, *Br J Radiol*, 2014, 87, 20140134.
47. I. Miladi, G. Le Duc, D. Kryza, A. Berniard, P. Mowat, S. Roux, J. Taleb, P. Bonazza, P. Perriat, F. Lux, O. Tillement, C. Billotey and M. Janier, *Journal of Biomaterials Applications*, 2013, 28, 385-394.
48. J. Liu, W. Wang, Q. Zhang, S. Zhang and Z. Yuan, *Biomacromolecules*, 2014, 15, 931-939.
49. S. M. Oliveira, C. A. Ribeiro, I. Cardoso and M. J. Saraiva, *J Alzheimers Dis*, 2011, 27, 429-439.
50. C. Duyckaerts, B. Delatour and M. C. Potier, *Acta Neuropathol*, 2009, 118, 5-36.
51. C. Glabe, *J Mol Neurosci*, 2001, 17, 137-145.
52. K. D. Volkova, V. B. Kovalska, A. O. Balanda, R. J. Vermeij, V. Subramaniam, Y. L. Slominskii and S. M. Yarmoluk, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2007, 70, 727-733.
53. Z. Medarova, S. Bonner-Weir, M. Lipes and A. Moore, *Diabetes*, 2005, 54, 1780-1788.
54. M. D. Ikonomovic, W. E. Klunk, E. E. Abrahamson, C. A. Mathis, J. C. Price, N. D. Tsopelas, B. J. Lopresti, S. Ziolk, W. Bi, W. R. Paljug, M. L. Debnath, C. E. Hope, B. A. Isanski, R. L. Hamilton and S. T. DeKosky, *Brain*, 2008, 131, 1630-1645.
55. M. H. Viet, S. T. Ngo, N. S. Lam and M. S. Li, *J Phys Chem B*, 2011, 115, 7433-7446.

56. A. Lockhart, J. R. Lamb, T. Osredkar, L. I. Sue, J. N. Joyce, L. Ye, V. Libri, D. Leppert and T. G. Beach, *Brain*, 2007, 130, 2607-2615.
57. T. M. Wengenack, C. R. Jack, M. Garwood and J. F. Poduslo, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2008, 35, S82-S88.
58. B. M. Austen, K. E. Paleologou, S. A. Ali, M. M. Qureshi, D. Allsop and O. M. El-Agnaf, *Biochemistry*, 2008, 47, 1984-1992.
59. A. Elias and A. Tsourkas, *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2009, 720-726.
60. N. Singh, G. J. Jenkins, R. Asadi and S. H. Doak, *Nano Rev*, 2010, 1.
61. C. Truillet, P. Bouziotis, C. Tsoukalas, J. Brugiere, M. Martini, L. Sancey, T. Brichart, F. Denat, F. Boschetti, U. Darbost, I. Bonnamour, D. Stellas, C. D. Anagnostopoulos, V. Koutoulidis, L. A. Mouloupoulos, P. Perriat, F. Lux and O. Tillement, *Contrast Media Mol Imaging*, 2015, 10, 309-319.
62. A. F. Martins, J. F. Morfin, A. Kubickova, V. Kubicek, F. Buron, F. Suzenet, M. Salerno, A. N. Lazar, C. Duyckaerts, N. Arlicot, D. Guilloteau, C. F. Geraldès and E. Toth, *ACS Med Chem Lett*, 2013, 4, 436-440.
63. G. Fotakis and J. A. Timbrell, *Toxicol Lett*, 2006, 160, 171-177.
64. K. Hasegawa, K. Ono, M. Yamada and H. Naiki, *Biochemistry*, 2002, 41, 13489-13498.
65. V. Episkopou, S. Maeda, S. Nishiguchi, K. Shimada, G. A. Gaitanaris, M. E. Gottesman and E. J. Robertson, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90, 2375-2379.
66. D. R. Borchelt, T. Ratovitski, J. van Lare, M. K. Lee, V. Gonzales, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, D. L. Price and S. S. Sisodia, *Neuron*, 1997, 19, 939-945.

Figures



Strategy for specific amyloid protein targeting using AGuIX grafted with a selected peptide of Aβ. The nanoparticles are supposed to target the end of Aβ fibrils (represented in green) by the selected and grafted peptide, but not to amyloid fibrils of transthyretin (represented in yellow). (C) Transmission electronic microscopy

pictures of Aβ amyloid fibrils after 7 days of incubation and (D) of transthyretin amyloid

Figure 1. (A) Schematic representation fibrils

formed with V30M mutated protein, of self-auto-aggregation process leading to at 20 days of incubation.

insoluble amyloid fibrils formation. (B)

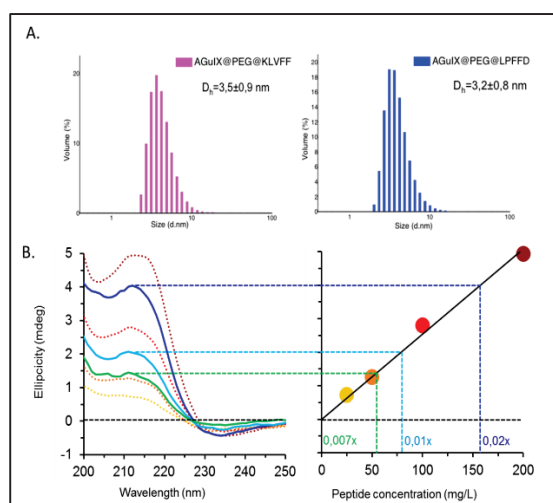


Figure 2: Amyloid peptide-targeted AGuIX characterization: (A) Hydrodynamic

diameter measurements of AGuIX@PEG@KLVFF (pink) and

AGuIX@PEG@LPFFD (blue) by dynamic light scattering measurements ($\lambda=532$ nm). B)

Quantification of the number of peptides grafted on AGuIX® nanoparticles. Circular dichroism signal of free KLVFF at 25, 50, 100,

200 mg/L at 212 nm (dotted lines) were reported on standard curve with reporting ellipticity of peptide on

nanoparticles in concentration function. To quantify the number of KLVFF grafted per

nanoparticle, various dilution (from 50 to 150 times) (continuous lines) were measure and reported on the graph with a number of

peptide correspondence.

	AGuIX	AGuIX@PEG	AGuIX@PEG @LPFFD	AGuIX@PEG @KLVFF	DOTAREM [®]
$r_1(s \cdot mM^{-1})$	10	12	13.2	14.1	3.4
$r_2(s \cdot mM^{-1})$	13.6	18.7	20.1	23.0	4.8
r_2/r_1	1.4	1.6	1.5	1.6	1.4

Table 1: Transversal and longitudinal relaxivities of the nanoparticles and the molecular contrast agent DOTAREM[®], and the ratio between their transversal and their longitudinal relaxivities at 60 MHz and 37°C.

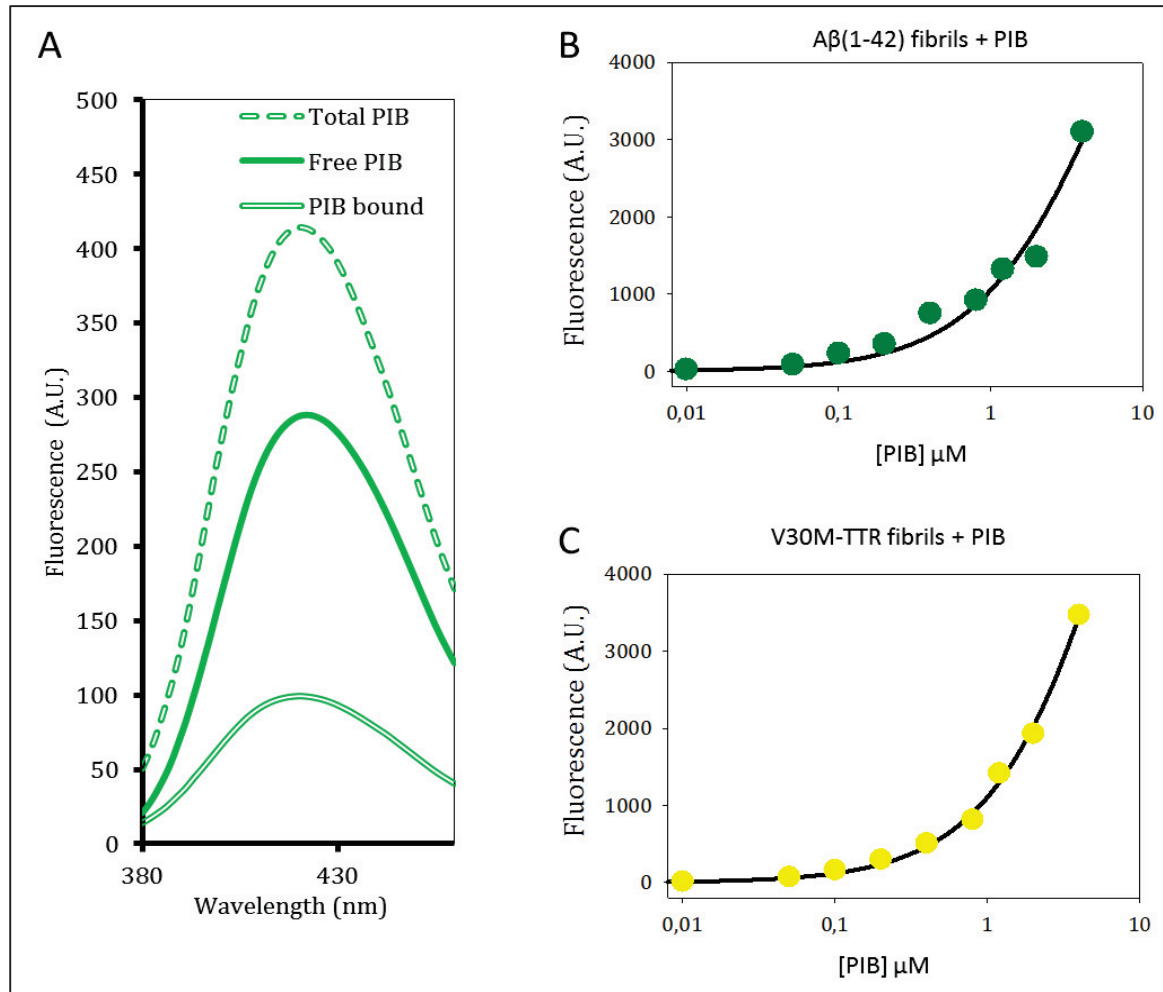
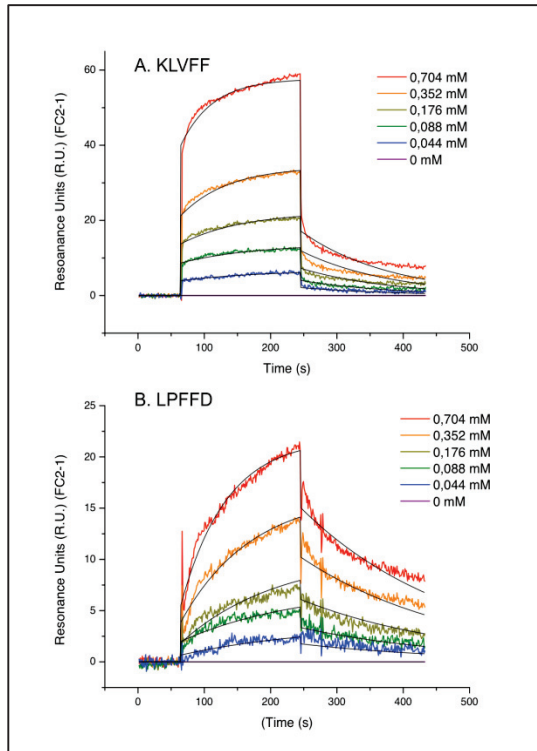


Figure 3: Spectrofluometry measurement of PIB binding to $A\beta$ (1-42) fibrils or V30M-TTR fibrils following partition experiments ($\lambda_{ex}=350\text{nm}$ and $\lambda_{em}=420\text{nm}$). (A) $2\mu\text{M}$ of PIB was added to $20\mu\text{M}$ of amyloid fibrils (dotted line) and after 60 min., a pellet with fibrils and PIB bound (double lines) was separated from a supernatant with PIB alone (solid line). (B & C) Binding plots by fluorescence response at 420nm of PIB bound on $A\beta(1-42)$ fibrils (B) or V30M-TTR fibrils (C) increasing concentration of PIB, fitted as Michaelis model (1:1).

**Figure 4:** Interaction of KLVFF (A) and

LPFFD

concentrations with A β (1-42) fibrils measured by SPR. The sensorgrams obtained (colored curves) were fitted thanks to the Biaevaluation® software with the Langmuir 1:1 model (black curves).

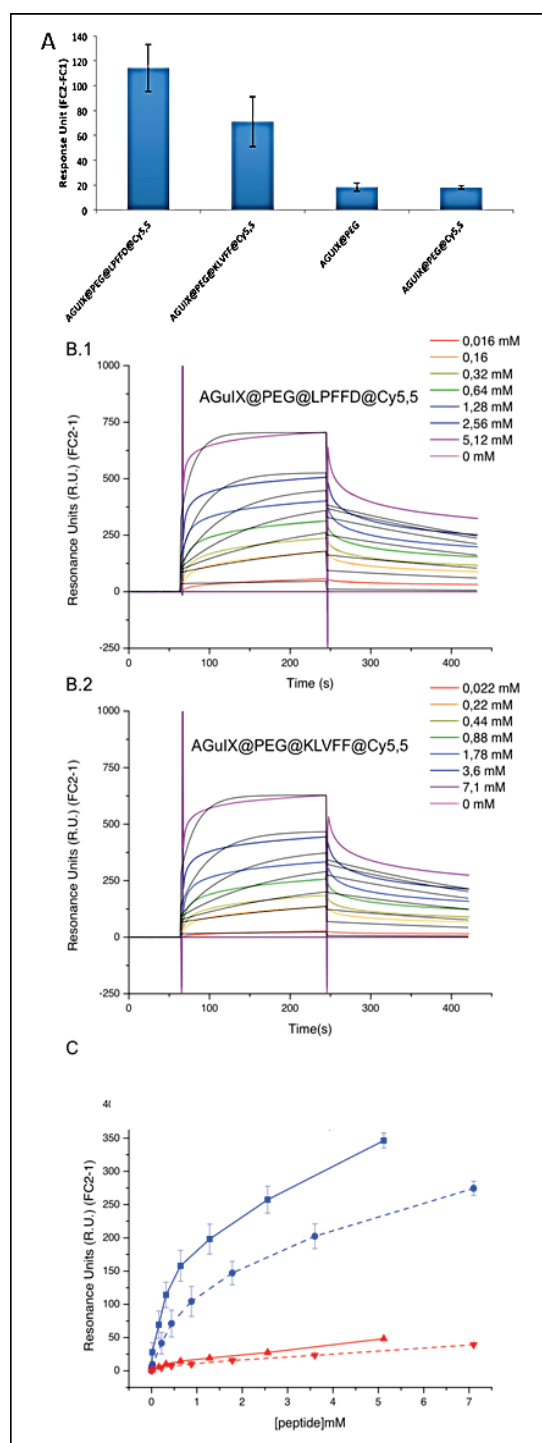


Figure 5: Interaction of functionalized nanoparticles for A β (1-42) fibrils or V30MTTR fibrils assessed by SPR experiments.

(A) Remaining signal of AGuIX@PEG, AGuIX@PEG@Cy5,5,

AGuIX@P

AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5,5 at 2,5 mM in Gd³⁺ on A β (1-42) fibrils. The R.U. were measured 141 s after the end of the analyte injection. (B) The sensorgrams (colored

curves)

AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5,5 (B.1) and for AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5,5 (B.2) on A β (142) fibrils were fitted thanks to the Biaevaluation[®] software with the Langmuir 1:1 model (black curves). (C) Remaining signal of AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5,5 (plain curves) and AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5,5

(dashed curves) on A β (1-42) fibrils (blue) and V30M-TTR fibrils (red). The R.U. values plotted on the graph correspond to the

measures at the time-point 141 s after the end of nanoparticles injection.

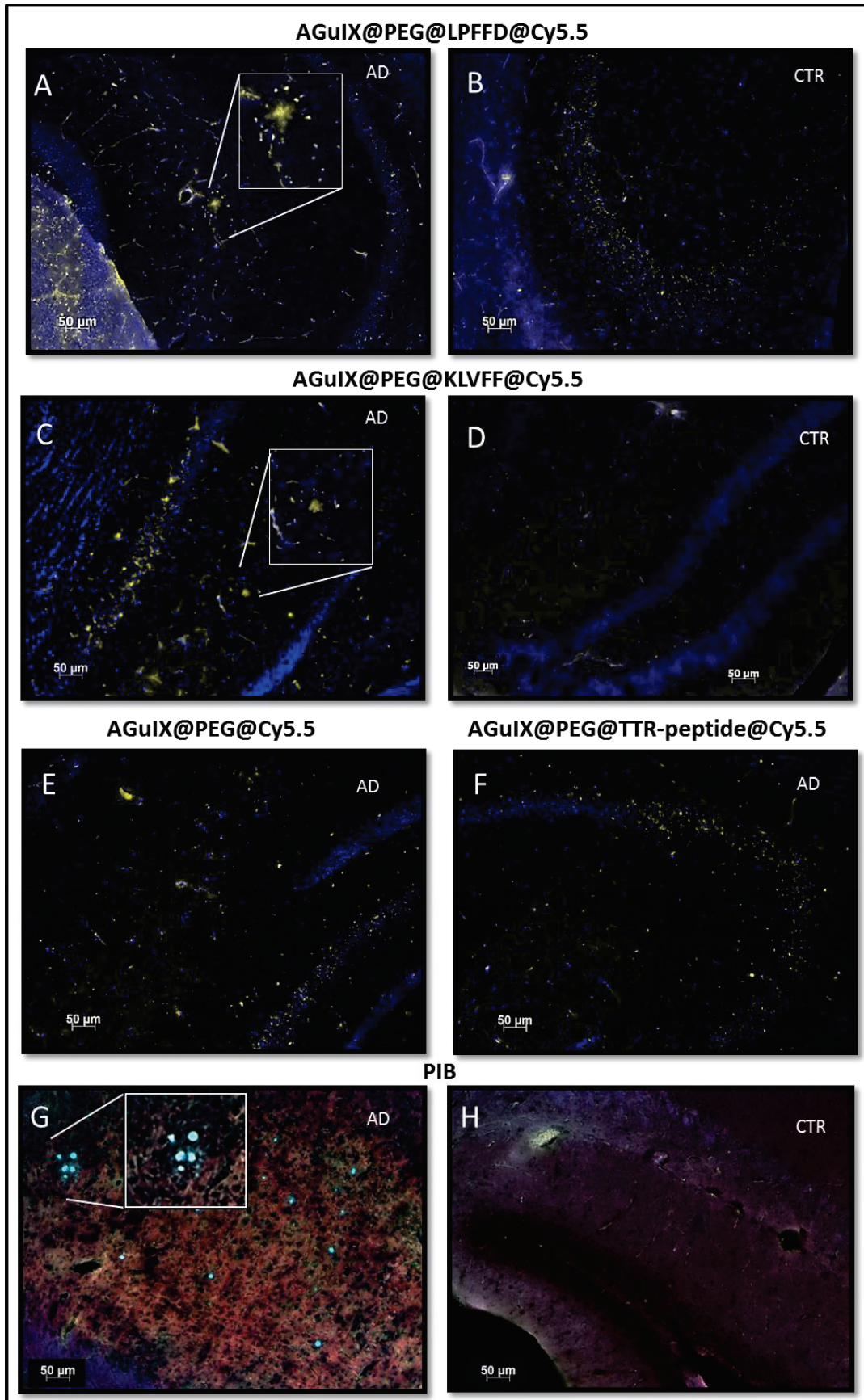


Figure 6: LPFFD and KLVFF vectorized nanoparticles hybridization on brain slices of APPswe/PS1A246/TTR transgenic (A,C,E,F,G) and control (B,D,H) mice. Imaging beta-amyloid plaques were visualized owing to Cy5.5 fluorescence grafted to AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5,5 (zoom in A), and AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5,5 (zoom in C), in the near-infra red (yellow color, $\lambda_{exc} = 620\text{nm}$ - $\lambda_{em} = 642\text{nm}$). Cellular nucleus of brain sections were located using Hoechst dye staining (blue color, $\lambda_{exc} = 350\text{ nm}$ - $\lambda_{em} = 405\text{nm}$). AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5,5 and AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5,5 binding specificity test were performed on brain section without amyloid plaques (B and D), and with nanoparticle without peptides, AGuIX@PEG@Cy5,5 (E), or with a non-related A β (1-42) peptide, AGuIX@PEG@TTR-peptide@Cy5,5 (F) on brain section with amyloid plaques. Positive control of amyloid burden was performed using PIB staining on brain sections with (G) and without amyloid plaques (H). Ligands binding are detected by fluorescence imaging of PIB at 400nm (blue color, G). Tissue architecture was highlighted by imaging actinphalloidin staining (G-H, red color, $\lambda_{exc} = 540\text{ nm}$ - $\lambda_{em} = 570\text{nm}$).

Supporting Information for:

Gd-nanoparticles functionalisation with specific peptides for β -amyloid plaques targeting

Marie Plissonneau^{2,3,#}, Jonathan Pansieri^{1,#}, Laurence Heinrich-Balard⁴, Jean-François Morfin⁵,

Nathalie Stransky-Heilkron⁶, Pascaline Rivory⁴, Pierre Mowat¹, Mireille

Dumoulin⁷, Richard Cohen^{4,8}, Éric Allémann⁶, Éva Tóth⁵, Maria Joao Saraiva⁹, Cédric Louis², Olivier

Tillement³, Vincent Forge¹, François Lux³, Christel Marquette^{1*}

1-Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, Université Grenoble Alpes, CEA Life Science

Division, CNRS, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France

2-Nano-H S.A.S , F-38070 Saint Quentin Fallavier, France

3-Institut Lumière Matière UMR5306 CNRS Université Claude Bernard Lyon 1, Domaine Scientifique de La Doua, 2 rue Victor Grignard 69622 Villeurbanne cedex, France

4 - Université de Lyon, Lyon, France 4bis - MATEIS UMR CNRS 5510, ISPB Faculté de Pharmacie, 69373 Lyon, France

5- Centre de biophysique moléculaire - UPR 4301- Rue Charles Sadron CS 80054 45071 Orléans cedex 2, France.

*6- School of pharmaceutical sciences University of Geneva, University of Lausanne
Pharmaceutical technology, Quai Ernest-Ansermet 30 1211 GENEVA, Switzerland*

7-Centre for Protein Engineering, Laboratory of Enzymology and Protein Folding Institut of Chemistry, B6 University of Liege Sart Tilman, 4000 LIEGE, Belgium

8 -Hospices Civils de Lyon, Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Lyon, France

9-Molecular Neurobiology Group, Institute of Biology, Molecular & Cellular, R. Campo Alegre 823 4150 Porto, Portugal

#Equal contribution.

**Corresponding author: christel.marquette@cea.fr*

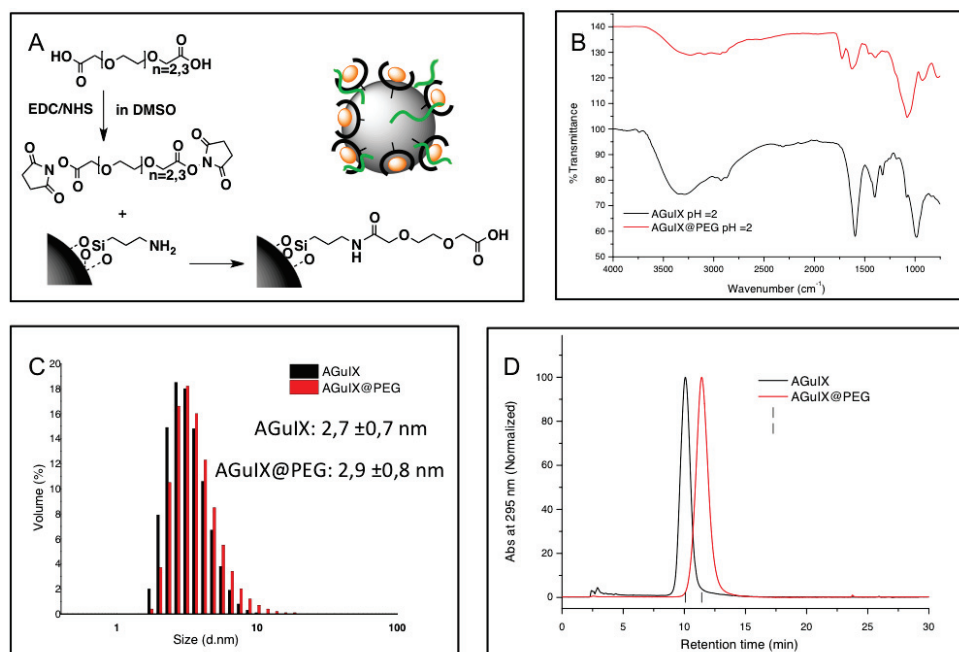


Figure S1: Characterization of functionalized nanoparticles:

(A) Reaction scheme of AGuIX Nps pegylation. (B) FTIR spectrum of AGuIX (black) and AGuIX@PEG (red) dried at pH=2. The FTIR spectrum of the dry products were acquired on IRAffinity-1, Shimadzu® with an ATR platform by applying attenuated total reflection Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy from 800 to 4000 cm⁻¹. The Nps suspensions were dried at 80°C overnight after adjusting the pH at 2 with HCl 0.12 M. The apparition of a peak at 1716 cm⁻¹ (ν_{C=O} stretch) observed by FTIR is characteristic of the introduction of carboxylic acid moiety. (C) AGuIX (black) and AGuIX@PEG (red) hydrodynamic diameter measurements by DLS (σ = 532 nm); the hydrodynamic diameter (D_H) of the AGuIX@PEG (2.9 ± 0.9 nm) showed a slight increase compared to the D_H of the AGuIX (2.7 ± 0.7 nm), (D) HPLC chromatograms obtained with detection by UV-Visible absorption (λ = 295 nm) for AGuIX (black) and the AGuIX@PEG (red). The retention time shift from 10.1 min. to 11.4 min. is observed in accordance with the Nps surface modification by PEG chains.

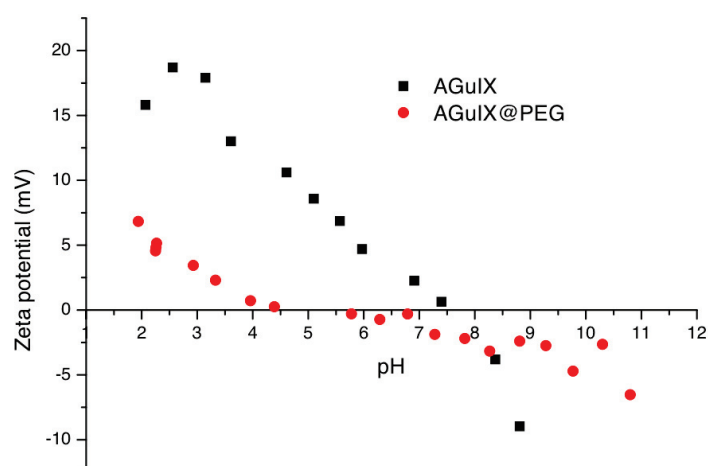


Figure S2: Zeta potential versus pH of AGuIX (black) and AGuIX@PEG (red).

ζ -Potential measurements were performed with a Zetasizer NanoZS (laser He-Ne 633 nm) equipped with a MPT-2 autotitrator device from Malvern Instrument®. The colloidal solutions were firstly diluted at 10 mM of Gd^{3+} in an aqueous solution containing 5 mM of NaCl. One measurement was performed starting at pH 5.5 and going to pH 2 by 0.12M HCl addition and another one starting from pH 5.5 and going to pH 12 by 0.1M NaOH addition.

The isoelectric point of the nanoparticles slightly decreased (from pH 7.5 to pH 6) in accordance with a modification of the nanoparticles surface charge obtained by changing an amine into a carboxylic acid.

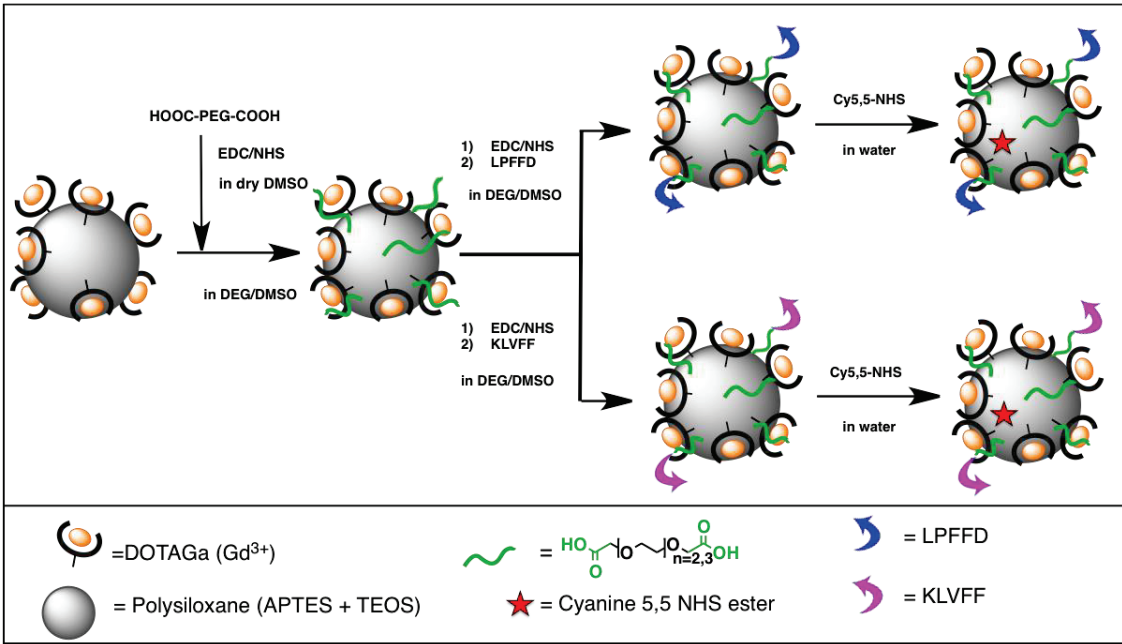


Figure S3: Reaction scheme for the synthesis of AGuIX@PEG@Peptide@Cy5.5

The AGuIX nanoparticles are very hydrophilic. On the contrary, peptides present a hydrophobic character due to their two phenylalanines residues. The coupling occurred in a DEG/DMSO mixture, allowing i) the limitation of the NHS ester hydrolysis, ii) the proper dispersion of both the nanoparticles and the hydrophobic peptides.

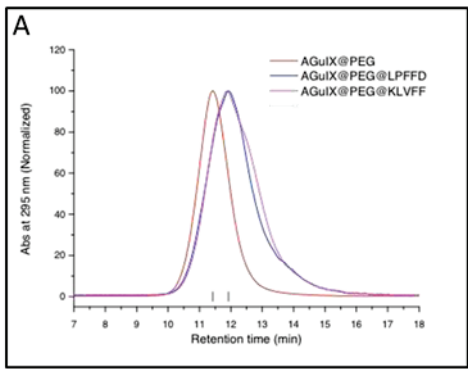


Figure S4: Chromatograms obtained with at UV-Visible absorption at $\lambda = 295$ nm of the AGuIX@PEG(red), AGuIX@PEG@LPFFD (blue) and AGuIX@PEG@KLVFF (pink). A slight shift of the retention time confirmed the grafting (11.9 min. for both peptide vectorized nanoparticles, against 11.4 min. for the PEG-nanoparticles). Besides, the Full Width at Half Maximum (FWHM) is almost twice larger for the peptide vectorized nanoparticles (1.6 min. for the AGuIX@PEG@LPFFD and 1.8 min. for the AGuIX@PEG@KLVFF versus 1.1 min. for the

AGuIX@PEG). These results suggest that the distribution of nanoparticles is wider after peptide grafting.

Elementary Analyses :

To evaluate the number of PEG chains grafted to the nanoparticles, elementary analyses were performed on the nanoparticles. The hypothesis that about 10 DOTA molecules are displayed on one nanoparticle was made. The molar ratio (i.e. Si/Gd, C/Gd and N/Gd) deduced from weight percentage allowed tracing back the approximate molecular formula of each nanoparticles.

	AGuIX	AGuIX@PEG	AGuIX@PEG@LPFFD	AGuIX@PEG@KLVFF
Si/Gd	4.9	5.7	5.6	5.9
C/Gd	26.6	33.2	40.8	40.0
N/Gd	6.5	7.1	9.0	8.9

Table S1: Molar ratio deduced from experimental weight percentage

Only gadolinium, silicon, carbon and nitrogen weight percentage were measured. Thus, water molecules and counter ions such as Na^+ or OH^- were taken into account. The molecular formulas were deduced with an absolute error below 0.5% of the weight percentage supplied by elementary analyses (Table S2).

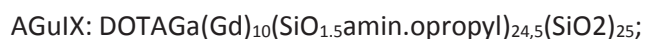
	AGuIX		AGuIX@PEG		AGuIX@PEG@LPFFD		AGuIX@PEG@KLVFF	
	Exp.	Theo.	Exp.	Theo.	Exp.	Theo.	Exp.	Theo.
%Gd	13,1	13,1	11,4	11,5	10,3	10,3	10,2	10,1
%Si	11,5	11,5	11,7	11,7	10,3	10,3	10,7	10,7
%N	7,6	7,6	7,2	7,2	8,3	8,0	8,1	7,9
%C	26,6	26,6	28,9	28,6	32,0	31,9	31,1	31,2

Table S2: Elementary analyses given in weight percent of element in the compound. For each sample, first the experimental weight percentages (carried out by the “Service Central d’Analyses”, CNRS and delivered with an absolute error of 0,5%), then the theoretical weight percentage deduced from the estimated molecular ratio.

	AGuIX	AGuIX@PEG	AGuIX@PEG@LPFFD	AGuIX@PEG@KLVFF
-NH₂ per Gd				
Elementary analysis	1.45	1.15	2.2	2.2
TNBS quantif.	1.55	1.15	2.2	2.2

Table S3 : Comparison of the primary amine content evaluated by elementary analysis and TNBS assays. These results allow assessing the molecular formula obtained by elementary analysis.

Altogether, these calculations are leading to the following formulas:



AGuIX@PEG: DOTAGa(Gd)₁₀(SiO_{1.5}amin.opropyl)₃₀(SiO₂)_{27,3}PEG₅.

AGuIX@PEG@LPFFD: DOTAGa(Gd)₁₀(SiO_{1.5}amin.opropyl)₃₆(SiO₂)₂₀PEG_{3,5}LPFFD₂;

AGuIX@PEG@KLFF: DOTAGa(Gd)₁₀(SiO_{1.5}amin.opropyl)₃₄(SiO₂)₂₅PEG_{3,5}KLFF₂.

Finally, these molecular formulas were assayed by measuring the number of free amines remaining in the nanoparticles thanks to TNBS assay.

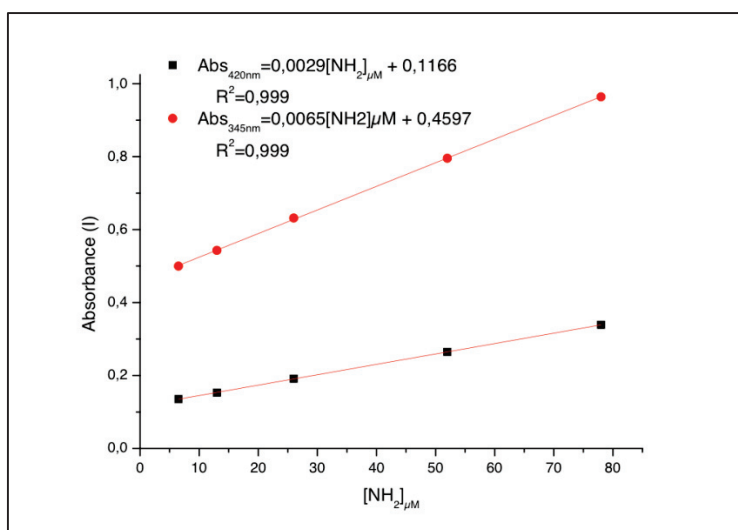


Figure S5: Standard curves of amine quantification in APTES/TEOS equimolar mixture by TNBS assays. i) Absorbance at 420 versus amine concentration (black), ii) Absorbance at 345 nm versus amine concentration (red). UV-Visible spectra were recorded using a UV-Vis spectrophotometer (Varian Cary50) in the range of 200 to 800 nm, with a Hellma semi-micro cell, 10 mm light path, 1400 μ L, manufactured from Suprasil quartz.

The quantification of free amines in nanoparticles solutions was conducted using trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) assays⁶⁰. The solutions to be assayed (10-500 μ M Gd³⁺) and a negative control containing only bicarbonate buffer were performed into 1 mL of 0.1M sodium bicarbonate, pH 8.5. A volume of 500 μ L of freshly prepared solution of TNBS at 2,5 mM was poured into each sample, well mixed and incubated for 2 hours at 37°C, leading to the formation of a highly chromogenic derivative. The reaction was then stopped by adding 500 μ L of 10%SDS and 250 μ L of 1N HCl. Finally, the absorbance spectrums of the samples were measured respectively at 345 and 420 nm.

Therefore, 2,4,6-trinitrobenzene 1-sulfonic acid reacts with primary amines to form a

chromogenic compound with specific absorption wavelength (345 nm and 420 nm)^{61,62}. The results were compared to the number of free amine deduced from the proposed molecular formulas, as expressed in the following formulas:

$$\text{AGuIX: } n\text{NH}_2 = n(\text{SiO}_{1,5}\text{amin.opropyl}) - n\text{DOTA}$$

$$\text{AGuIX@PEG: } n\text{NH}_2 = n(\text{SiO}_{1,5}\text{amin.opropyl}) - n\text{PEG} - n\text{DOTA}$$

$$\text{AGuIX@PEG@LPFFD: } \text{nb}(\text{NH}_2) = \text{nb}(\text{SiO}_{1,5}\text{amin.opropyl}) - \text{nb}(\text{DOTAGa}) - \text{nb}(\text{PEG})$$

$$\text{AGuIX@PEG@KLVFF: } \text{nb}(\text{NH}_2) = \text{nb}(\text{SiO}_{1,5}\text{amin.opropyl}) - \text{nb}(\text{DOTAGa}) - \text{nb}(\text{PEG}) + \text{nb}(\text{KLVFF})$$

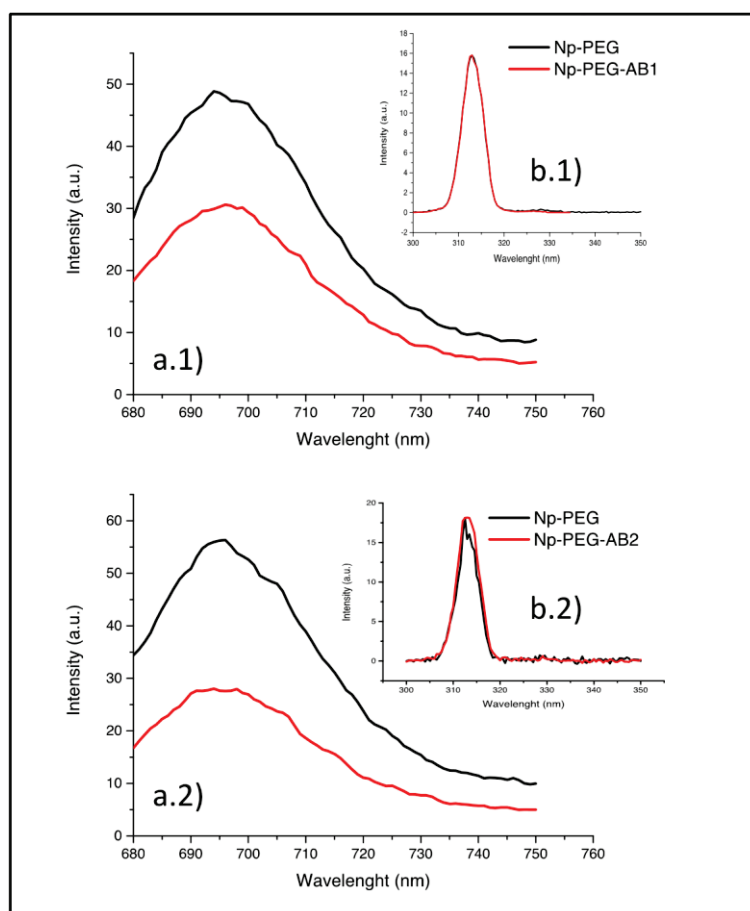


Figure S6: The cyanine 5.5 presents characteristic absorption and emission wavelength $\lambda_{\text{ex,max cy5,5}} = 675 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em,max cy5,5}} = 692 \text{ nm}$. The DOTAGA(Gd^{3+}) chelate grafted at the Np surface present phosphorescence properties: $\lambda_{\text{ex,max DOTAGA(Gd}^{3+})} = 275 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em,max DOTAGA(Gd}^{3+})} = 312 \text{ nm}$. a) Fluorescence spectra of cyanine 5.5 before and after removal of ungrafted dye ($\lambda_{\text{exc}}=675 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em}}=694 \text{ nm}$) respectively for AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5 (a.1) and AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5 (a.2). After normalization at the same DOTA(Gd) phosphorescence intensity. b) Normalized phosphorescence spectrums of DOTA(Gd) for AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5 (b.1) and AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5 (b.2).

	Cyanine 5,5 grafting yield	Cya5,5/Gd ³⁺	Cya5,5/Np
AGuIX@PEG@LPFFD@Cy5.5	61%	0.6/1000	1/167
AGuIX@PEG@KLVFF@Cy5.5	50%	0.5/1000	1/200

Table S4: The yield of the grafting was calculated thanks to the comparison of the cyanine fluorescence and the DOTA(Gd³⁺) chelate before and after removal of the ungrafted dye by tangential purification.

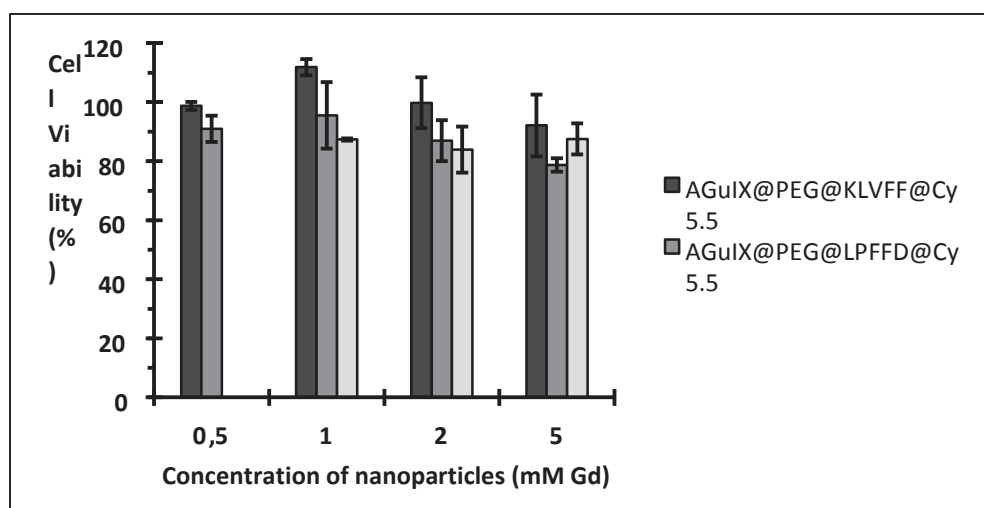
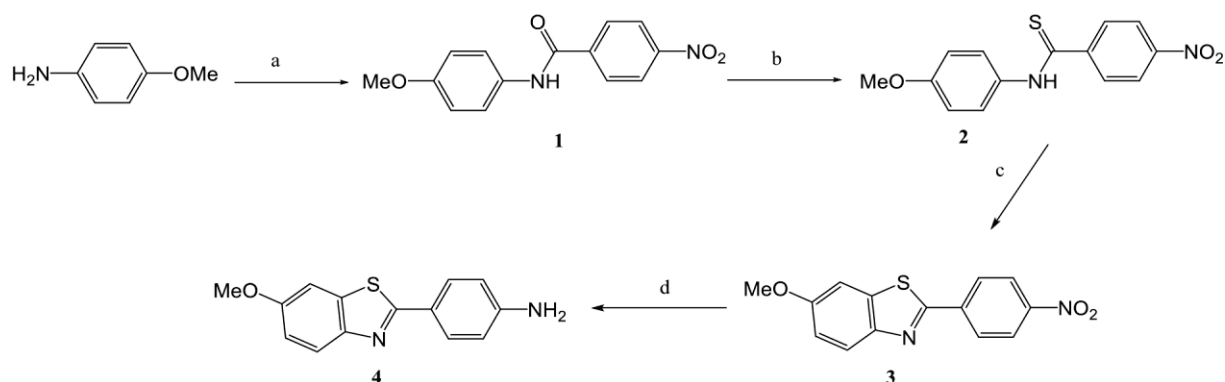


Figure S7: Effect of nanoparticles on cell viability. The innocuousness of the grafted Nps was assessed using a neuronal cell line SH-SY5Y. The cell viability was assessed using the 3-(4,5dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay⁶³. SH-SY5Y cells were cultured in DMEM/F12 medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin/amphotericin B. For the assay, the cells were plated at a density of 50 000 cells/well in 200 μ l of medium. Twenty four hours later, 0.5, 1, 2 or 5 mM of AGuIX@PEG@KLVFF (dark gray histograms) or AGuIX@PEG@LPFFD (gray histograms) or 1, 2 or 5mM of AGuIX@PEG (light gray histograms). Nps were added to the cells and incubated at 37°C, 5% CO₂. One hour later, 10 μ L of MTT solutions (12 mM) was added into each well, and the plates were incubated for another 2 h at 37°C, 5% CO₂. The culture medium was removed, and the precipitated cells were lysed using DMSO. After 10 minutes, the purple crystals were dissolved completely; the cell viability was calculated from the absorbance signals measured by a plate reader (Tecan Infinite M200) at 540 nm. The absorbance of the wells containing medium only, corresponding to the background, were subtracted from the value of each reading. Data are expressed in % of cell viability, each MTT analysis was carried out on triplicate samples. As expected, the amount of live cells decrease with the augmentation of nanoparticles concentration, and more than 80 % are alive when they were incubated in the presence of up to 2mM of nanoparticles, and more than 70% at 5mM of nanoparticles.

Figure S8: PiB derivative synthesis details



Schematic synthesis of PiB derivative.

Reagents and conditions: a) Nitrobenzoyl chloride, triethylamine, THF, 0°C, 96%. b) Lawesson's reagent, chlorobenzene, reflux, 85%. c) $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, NaOH_{aq} , reflux, 52%. d) SnCl_2 , Ethanol, reflux, 92%.

Synthesis protocol: N-(4'-methoxyphenyl)-4-nitrobenzamide (1): To a solution of 60 mL of p-anisidine (3.08 g, 25 mmol) and dry triethylamine (3.48 mL, 25 mmol) in freshly distilled THF, was added dropwise at 0°C, 30 mL of a solution of 4-nitrobenzoyl chloride (3.03 mL, 25 mmol) in distilled THF over 20 min.. The mixture was stirred for 1hr at 0°C and then for 1h at room temperature. The white precipitate was filtered and the solution was concentrated under vacuum to 30 mL. Then 50 mL of water was added and the solution was allowed to stand overnight at 4 °C. The yellow-green precipitate was filtered and dried under vacuum to give 6.53 g of compound 1 (96 %). ^1H NMR (CDCl_3 , 25°C, 500 MHz): δ (ppm) 3.75 (s, 3H), 6.95 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.67 (d, $3J = 9.0$ Hz, 2H), 8.17 (d, $3J = 8.8$ Hz, 2H), 8.36 (d, $3J = 8.8$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 25°C, 126 MHz): δ (ppm) 55.2 (1C), 113.8 (2C), 122.1 (2C), 123.5 (2C), 129.1 (2C), 131.8 (1C), 140.7 (1C), 149.0 (1C), 155.9 (1C), 163.4 (1C). HRMS (ESI): m/z : calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_4$: 273.08698, found 273.08697.

N-(4'-methoxyphenyl)-4-nitrothiobenzamide (2): compound 1 (6 g, 22 mmol) was dissolved in 15 mL of chlorobenzene. Then, Lawesson's reagent (5.34 g, 13.2 mmol) was added to the solution and the mixture was refluxed 4h. After cooling, the solution was allowed to stand overnight at 0°C. The orange precipitate was filtered and then dissolved with acetone to separate the residue of Lawesson's reagent. The solution was evaporated to dryness to give 5.40 g of the compound 2 (85 %). ^1H NMR (DMSO, 25°C, 500 MHz): δ (ppm) 3.37 (s, 1H), 3.78 (s, 3H), 7.02 (d, $3J = 8.8$ Hz, 2H), 7.76 (d, $3J = 8.8$ Hz, 2H), 7.99 (d, $3J = 8.6$ Hz, 2H), 8.30 (d, $3J = 8.6$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (DMSO, 25°C, 126 MHz): δ (ppm) 55.3 (1C), 113.7 (C-1,5), 123.3 (2C), 125.3 (2C),

128.6 (2C), 132.6 (1C), 147.9 (1C), 148.1 (1C), 157.5 (1C), 194.1 (1C). HRMS (ESI): m/z : calcd for $C_{14}H_{13}N_2O_3S$: 289.06414 , found 289.06421.

2-(4'-nitrophenyl)-6-methoxybenzothiazol (3): Compound 2 (5 g, 17.3 mmol) was wetted with 3 mL of ethanol and then 15 mL of 10% aqueous NaOH was added. The mixture was diluted with water to provide a final suspension of 5% aqueous NaOH. The mixture was slowly added over 45 min. into a refluxed solution of potassium hexacyanoferrate(III) (22.8 g, 69.4 mmol). Then the mixture was refluxed 3h. The brown precipitate was filtered and dried under vacuum and 100 mL of a mixture of dichloromethane-methanol (75/25 v/v) was added. The solid was filtered off and the solvent was evaporated. Then a 100 mL of a mixture of chloroform-methanol (20/80 v/v) was added to the residue and the brown-yellow precipitate was filtered to give 2.56 g of compound 3 (52 %). 1H NMR ($CDCl_3$, 25°C, 500 MHz): δ (ppm) 3.93 (s, 3H), 7.16 (dd, 1H, 3J = 8.9 Hz, 4J = 2.4 Hz), 7.40 (d, 1H, 4J = 2.4 Hz), 8.02 (d, 3J = 8.9 Hz, 1H, H-4), 8.22 (d, 3J = 8.9 Hz, 2H), 8.35 (d, 3J = 8.9 Hz, 2H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 25°C, 126 MHz): δ (ppm) 55.2 (1C), 104.2 (1C), 116.8 (1C), 124.5 (2C), 124.7 (1C), 128.0 (1C), 137.3 (1C), 139.6 (1C), 148.9 (1C), 148.9 (1C), 158.8 (1C), 162.8 (1C). HRMS (ESI): m/z : calcd for $C_{14}H_{11}N_2O_3S$: 287.04849, found 287.04854.

2-(4'-aminophenyl)-6-methoxybenzothiazol (4): To a solution of 3 (2.3 g, 8 mmol) in 120 mL of ethanol was added Sn(II) chloride dihydrate (5.87 g, 48.2 mmol) and the mixture was refluxed for 4 hrs. The ethanol was evaporated and the residue was dissolved in ethyl acetate.

The resulting solution was washed 3 times with an aqueous solution of 1M of NaOH and the organic phase was collected and washed 2 times with 25 mL of water. The organic phase was collected, dried over $MgSO_4$ and the solvent was evaporated. The crude product was purified by flash chromatography with dichloromethane-ethyl acetate (8/1). 1.89 g of compound 4 (92 %) was obtained. 1H NMR ($CDCl_3$, 25°C, 500 MHz): δ (ppm) 3.88 (s, 3H), 3.98 (s, 1H), 6.73 (d, 3J = 8.5 Hz, 2H), 7.05 (dd, 1H, 3J = 8.9 Hz, 4J = 2.4 Hz), 7.32 (d, 4J = 2.4 Hz, 1H), 7.85 (d, 3J = 8.5 Hz, 2H), 7.87 (d, 3J = 8.9 Hz, 1H). HRMS (ESI): m/z : calcd for $C_{14}H_{13}N_2OS$: 257.07431, found 257.07442.

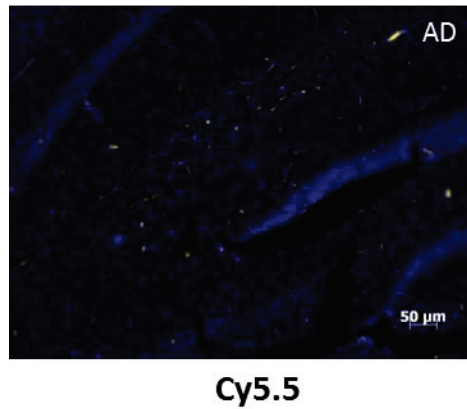


Figure S9: Control of the non-binding of Cy5.5 dye to amyloid plaque in brain section of AD mouse model. Pictures were photographed in the CA3-dentate gyrus area of the hippocampus.

3.3.3. RESULTATS COMPLEMENTAIRES

L'article ci-dessus détaille la stratégie mise en place pour (i) vectoriser les nanoparticules AGuIX avec les deux peptides β -breaker LPFFD et KLVFF, (ii) étudier leur affinité respective pour les fibres amyloïdes *in vitro*, par des techniques de fluorescence et de résonance plasmonique de surface, (iii) observer les interactions entre les nanoparticules vectorisées et les fibres amyloïdes *ex vivo* sur des coupes de cerveau de souris modèles.

La partie suivante explicite certains résultats obtenus dans le cadre de cette publication.

3.3.3.1. VALIDATION DU COUPLAGE DES PEPTIDES SUR LES NANOPARTICULES AGuIX@PEPTIDES

3.3.3.1.1. CARACTERISATIONS QUALITATIVES

Les peptides LPFFD et KLVFF sont greffés aux nanoparticules AGuIX@PEG *via* couplage peptidique entre leur amine terminales et les acides carboxyliques présents aux extrémités des chaînes de polyéthylène glycol. La réaction a lieu dans un mélange de DEG et de DMSO. Ce milieu réactionnel permet de disperser à la fois les nanoparticules hydrophiles et les peptides hydrophobes. En milieu aqueux, les peptides qui possèdent chacun deux acides aminés phénylalanine, pouvaient précipiter ou donner lieu à la formation d'un gel. De plus, la réalisation du couplage dans ce co-solvant organique polaire permet de limiter la principale réaction de compétition : l'hydrolyse de l'ester-NHS, et permet ainsi d'augmenter le rendement de fonctionnalisation des nanoparticules.

En comparaison aux nanoparticules AGuIX@PEG, les Nps vectorisées par l'un ou l'autre peptide présentent une augmentation relative de leur diamètre hydrodynamique, de leur temps de rétention en HPLC et de leurs vitesses de relaxation r_1 et r_2 .

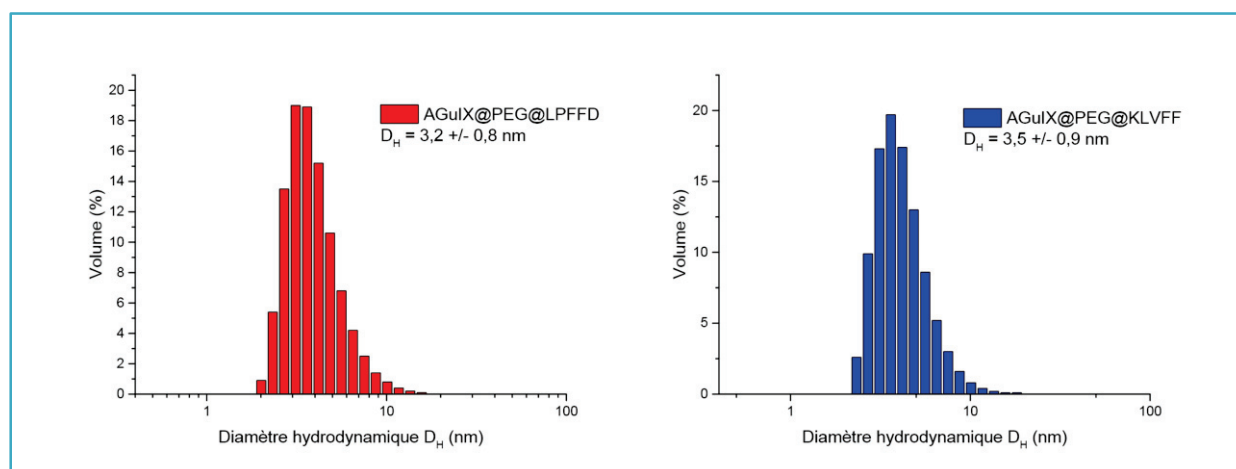


Figure 0-1: Diamètre hydrodynamique des nanoparticules AGuIX@PEG@peptides. Mesure réalisée à 5 mM en Gd³⁺ sur le NanoZS ($\lambda=532$ nm).

D'après la figure 3-16, on observe que le D_H des Nps, qui était de $2,9 \pm 0,9$ nm pour les AGuIX@PEG, augmente pour atteindre les valeurs de 3,2 nm et 3,5 nm pour les Nps vectorisées par LPFFD et KLVFF respectivement.

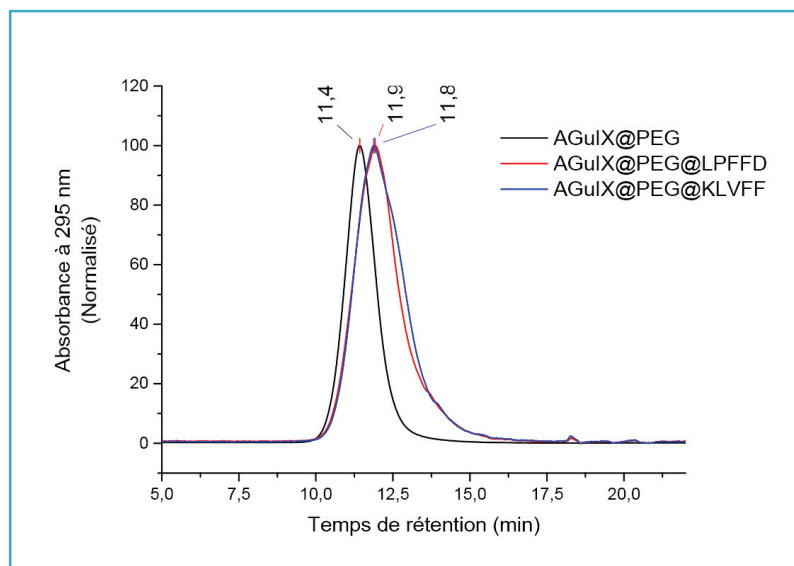


Figure 0-2: Chromatogrammes avec détection par absorption UV-Visible à 295 nm des nanoparticules AGuIX@PEG avant et après vectorisation par les peptides LPFFD et KLVFF.

De même, si le temps de rétention des nanoparticules vectorisées augmente légèrement de quelques dixièmes de minutes, leur largeur à mi-hauteur est pratiquement doublée par rapport aux AGuIX@PEG de départ. Ce résultat semble indiquer que les Nps vectorisées représentent une population plus large de nanoparticules.

Tableau 0-1 : Relaxivités longitudinales et transversales des différentes nanoparticules, mesurées à 60 MHz à 37°C, ainsi que leur ratio.

	AGuIX@PEG	AGuIX@PEG@LPFFD	AGuIX@PEG@KLVFF
$r_1(s^{-1}.mM^{-1})$	12	13,2	14,1
$r_2(s^{-1}.mM^{-1})$	18,7	20,1	23,0
r_2/r_1	1,6	1,5	1,6

Enfin, ces augmentations relatives de temps de rétention et de diamètre hydrodynamique sont en accord avec la croissance des valeurs de relaxivité longitudinales et transversales des Nps. En effet, ces valeurs sont fonctions de la taille et de la masse des objets paramagnétiques (voir §1.4.3.1).

3.3.3.2. QUANTIFICATION DU NOMBRE DE PEPTIDES

3.3.3.2.1. DICHROÏSME CIRCULAIRE

La quantification du nombre de peptides greffés aux nanoparticules est réalisée par Dichroïsme Circulaire (DC) au sein de l'équipe AFFOND du CEA de Grenoble.

Un matériau peut être analysé en dichroïsme circulaire s'il absorbe différemment la lumière polarisée gauche ou la lumière polarisée droite.

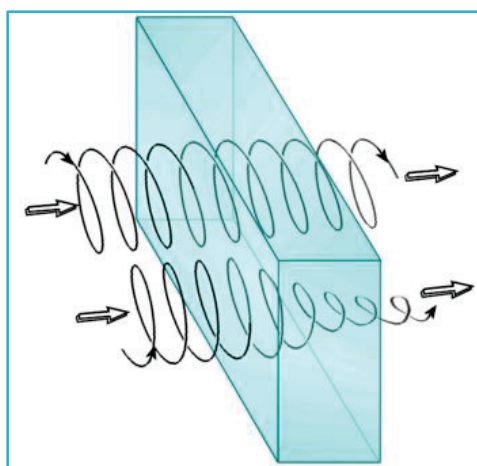


Figure 0-3 : Un matériau qui présente un dichroïsme circulaire absorbe différemment la lumière polarisée gauche ou la lumière polarisée droite.

En biochimie, le DC est couramment utilisé afin d'étudier les structures secondaires et tridimensionnelles des protéines. Par cette technique, les structures en hélices α ou feuillets β présentent des signaux caractéristiques (Figure 0-4) [149]. Ainsi Greenfield expose dans la figure suivante les spectres obtenus pour le collagène, qui sous sa forme native triple hélice, présente un minimum caractéristique aux alentours de 195 nm. Dans sa forme dénaturée, la protéine ne présente pas de signal notable. Au cours de la thèse, cette technique a été également utilisée afin de prouver la présence de structures en feuillets β dans les solutions de fibres amyloïdes soniquées (Voir partie immobilisation des fibres sur la puce Biacore).

En absorption par dichroïsme circulaire, on mesure la différence d'absorption entre les deux composantes de la lumière polarisée $\Delta\epsilon$. Or, pour des valeurs d'absorption inférieures à 1, celle-ci est directement proportionnelle à la concentration en molécule chirale.

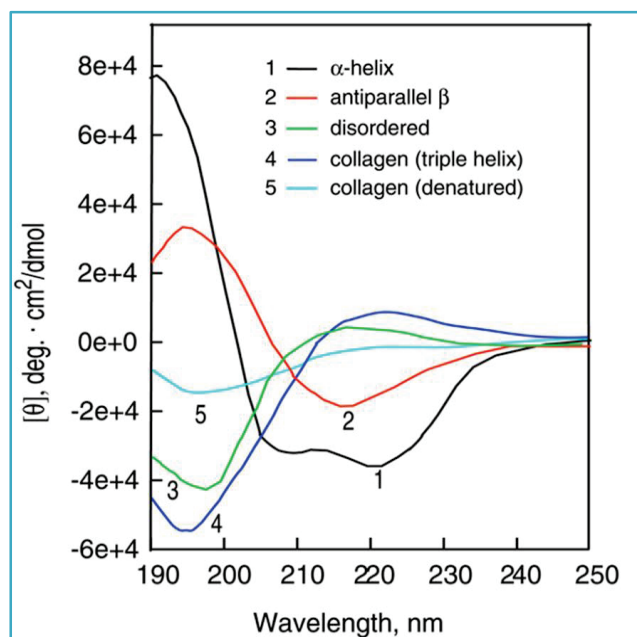


Figure 0-4: Spectres de Dichroïsme Circulaire de la poly-L-lysine à pH 11 en conformation hélice α (1) ou feuillets β antiparallèle (2) et à pH 5,7 (3) et spectres du collagène dans sa forme native triple hélice (4) ou dénaturée (5).

Les peptides, qui sont des molécules chirales, n'absorbent pas identiquement la lumière polarisée droite et la lumière polarisée gauche. Ils peuvent donc être quantifiés par la mesure de leur absorbance en DC. Ainsi, après réalisation d'une gamme étalon pour chaque peptide, nos collaborateurs du CEA de Grenoble ont été capables de déterminer la concentration en peptide par équivalent de Gd^{3+} .

D'après ces résultats, les nanoparticules AGuIX@PEG@LPFFD comportent 0,16 peptide / Gd^{3+} et les

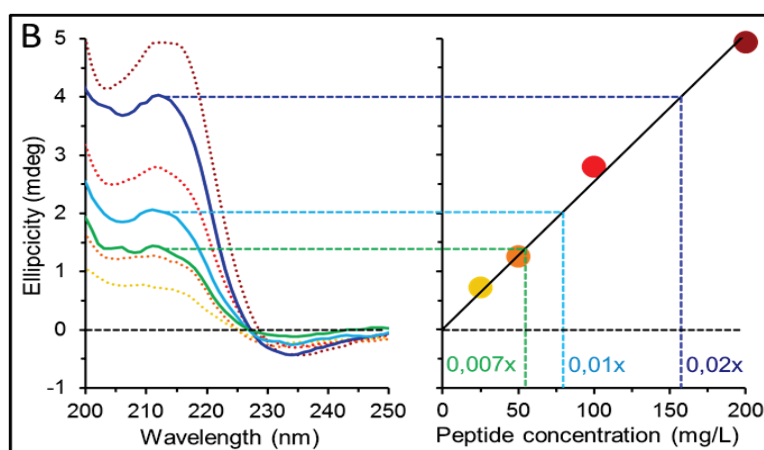


Figure 0-5: Quantification des peptides sur les nanoparticules AGuIX: Spectres de dichroïsme circulaire du peptide KLVFF et des AGuIX@PEG@KLVFF à différentes concentrations

nanoparticules AGuIX@PEG@KLVFF 0,22 peptide/ Gd^{3+} . En partant de l'hypothèse que les Nps présentent toujours 10 chélates DOTAGA(Gd^{3+}) par nanoparticules, le rendement de vectorisation

calculé par cette technique est donc de 1,6 LPFFD/Np et 2,2 KLVFF/Np respectivement.

3.3.3.2.2. PROPOSITION D'UNE FORMULE BRUTE

Comme explicité dans le chapitre 2 (voir §2.2.1), une formule brute des nanoparticules peut être proposée à partir des résultats d'analyse élémentaire et du dosage des amines libres.

A partir du pourcentage massique des éléments gadolinium, silicium, azote et carbone (Tableau 3-5), les ratios molaires par rapport à une mole de gadolinium sont calculés (Tableau 3-4). En comparant ces ratios molaires avant et après greffage des peptides, on observe une augmentation des ratios de carbone et d'azote chez les Nps vectorisées, or, le ratio de silicium quant à lui reste constant. Les peptides étant principalement constitués de carbone, d'azote d'oxygène et d'hydrogène, ces résultats sont en accord avec une fonctionnalisation des Nps AGuIX par les deux vecteurs LPFFD et KLVFF.

Tableau 0-2 : Ratio molaire des différents éléments par rapport à une mole de gadolinium

	AGuIX@PEG	AGuIX@PEG@LPFFD	AGuIX@PEG@KLVFF
Si/Gd	5,7	5,6	5,9
C/Gd	33,2	40,8	40,0
N/Gd	7,1	9,0	8,9

En connaissant la composition chimique en chacun des éléments analysés des différents constituants des nanoparticules : (SiO_2 ; $\text{SiO}_{1,5}$ aminopropyl ; DOTAGA(Gd^{3+}), PEG et peptides), il est alors possible de résoudre un système de plusieurs équations à plusieurs inconnues afin de proposer les formules brutes suivantes :



La dernière étape consiste à recalculer les pourcentages massiques en chaque élément analysé à partir de ces formules brutes théoriques. Lors de cette étape, il convient de prendre en compte une masse « inconnue » correspondant à la masse des éléments non analysés, (comme l'hydrogène et l'oxygène de l'eau). L'écart entre les résultats expérimentaux et théoriques est inférieur à l'erreur absolue des résultats expérimentaux (0,5%) (Tableau 3-5).

Tableau 0-3: Comparaison des pourcentages massiques de chaque élément obtenus expérimentalement ou calculés à partir de la formule brute théorique.

AGuIX@PEG			AGuIX@PEG@LPFFD		AGuIX@PEG@KLVFF	
	Exp.	Theo.	Exp.	Theo.	Exp.	Theo.
%Gd	11,4	11,5	10,3	10,3	10,2	10,1
%Si	11,7	11,7	10,3	10,3	10,7	10,7
%N	7,2	7,2	8,3	8,0	8,1	7,9
%C	28,9	28,6	32,0	31,9	31,1	31,2

Enfin, ces formules brutes sont corroborées par la mesure du nombre d'amines libres par dosage TNBS (voir §2.2.2). Les groupements DOTAGa ou HOOC-PEG-COOH sont tous deux greffés aux nanoparticules AGuIX par couplage peptidique avec les amines issues du réseau de polysiloxane. De plus, le peptide KLVFF possède deux amines primaires (son amine terminale et une amine issue de son a.a. lysine). Le calcul pour déterminer le nombre d'amines primaires disponible à partir de la formule brute théorique est donc le suivant :

$$\text{AGuIX@PEG@LPFFD: nb (NH}_2\text{) = nb (SiO}_{1,5}\text{aminopropyl) - nb (DOTAGa) - nb (PEG)}$$

$$\text{AGuIX@PEG@KLVFF: nb (NH}_2\text{) = nb (SiO}_{1,5}\text{aminopropyl) - nb (DOTAGa) - nb (PEG) + nb (KLVFF)}$$

Tableau 0-4: Comparaison de la quantité d'amines primaires obtenues théoriquement à partir de la formule brute propose et expérimentalement à partir du dosage TNBS.

-NH ₂ par Gd	AGuIX@PEG	AGuIX@PEG@LPFFD	AGuIX@PEG@KLVFF
Analyse élémentaire	1,15	2,2	2,2
TNBS quantif.	1,15	2,2	2,2

En conclusion, toutes les différentes techniques d'analyses sont en accord et montrent qu'environ deux peptides LPFFD et KLVFF ont été greffés à la surface des nanoparticules AGuIX

3.3.3.3. MESURE DE L'AFFINITE DES NANOPARTICULES PAR RESONANCE PLASMONIQUE DE SURFACE

Les nanoparticules AGuIX@PEG@Peptide ont été analysées par résonance plasmonique de surface sur un appareil Biacore 2000®. La puce CM3 utilisée pour ces expériences est fonctionnalisée par 1200 R.U. de fibres Aβ sur le canal 2 et 800 R.U. de fibres TTR sur le canal 4. Les canaux 1 et 3, quant à eux, ont été désactivés par de l'éthanolamine et utilisés comme référence. Ainsi, les résultats suivants sont calculés à partir de la différence de signal entre le canal fonctionnalisé par les fibres et le canal de référence : respectivement FC2-FC1 et FC4-FC3.

Pour de futures expériences d'histologie, les nanoparticules AGuIX@PEG@Peptide doivent être marquées par un fluorophore, ici la cyanine 5,5. Afin de vérifier que la présence de ce fluorophore organique insaturé n'introduit pas de biais dans les interactions étudiées, les réponses relatives des AGuIX@PEG; AGuIX@PEG@Cy5,5, et AGuIX@PEG@Peptides@Cy5,5 ont été comparées après injection à 2,5 mM en Gd^{3+} dans le tampon HBS-P contenant 10% (volumique) de dextran liquide.

Il apparaît qu'aucune des quatre nanoparticules testées ne présente une affinité particulière pour les fibres TTR. Dans le cas des fibres $A\beta$, le signal de résonance des nanoparticules non vectorisée est équivalent, que les AGuIX soient marquées par le fluorophore ou non. Les nanoparticules vectorisées, quant à elles, présentent un signal de résonance significativement supérieur à celui des Nps précédentes. Ce résultat indique que l'introduction de fluorophore à la surface des Nps (ici 1/2000 Gd^{3+} ou 1/200 Nps) n'induit pas d'affinité non spécifique des objets. Le signal observé est bien dû à l'introduction des peptides β -breaker.

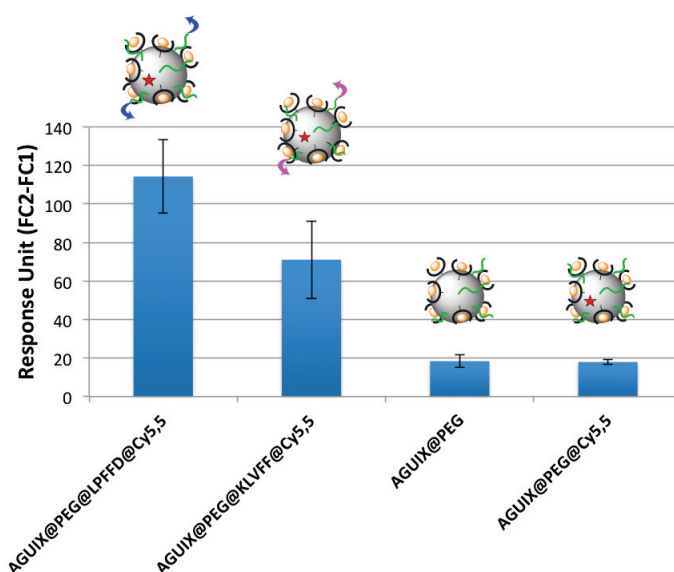


Figure 0-6 : Comparaison de la réponse entre les AGuIX@PEG, AGuIX@PEG@Cy5.5 et les AGuIX@PEG@peptide@Cy5.5 à 2.5 mM en Gd^{3+} dans le tampon HBS-P (10% volumique de dextran liquide) sur les puces CM3 fonctionnalisées respectivement par 1200 R.U. de fibres Abeta (bleu) et 800 R.U. de fibres TTR (rouge).

Les nanoparticules vectorisées sont ensuite testées à différentes concentrations afin de déterminer leur constante de dissociation pour les fibres amyloïdes. Après cinq cycles d'échauffement de l'appareil réalisés avec du tampon HBS-P, chaque échantillon de nanoparticules vectorisées est injecté 3 fois dans l'appareil à des concentrations en peptide allant de 0,02 mM à 6,4 mM. Afin de comparer les résultats obtenus entre les fibres $A\beta$ et les fibres TTR, les résultats (en R.U.) sont

normalisés par rapport aux taux d'immobilisation respectifs de chacun des deux types de fibres. Les moyennes de chacune des 3 mesures (en R.U. normalisés) sont enfin tracées en fonction de la concentration en peptide injecté et modélisées avec le modèle de Michaelis-Menten d'ordre 1 (Figure 0-7).

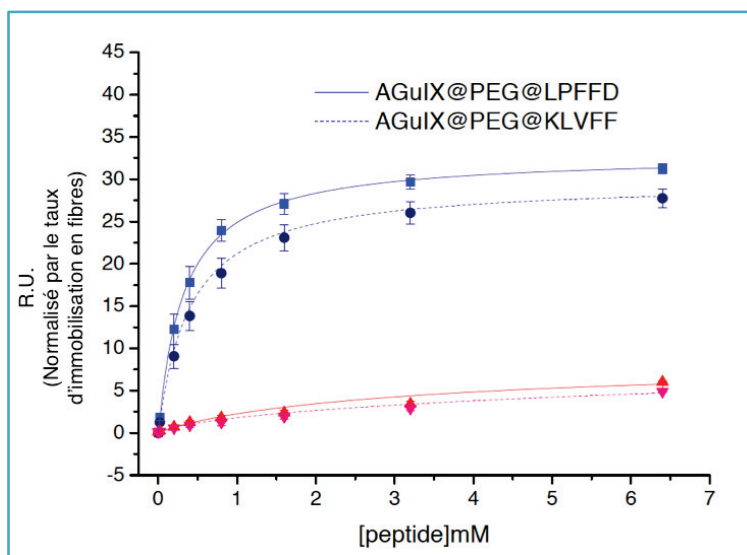


Figure 0-7 : Signal de résonance (R.U.) des Nps vectorisées pour les fibres Aβ (bleu) et TTR (rose) en fonction de la concentration en peptide (mM).

Les nanoparticules vectorisées par les peptides LPFFD et KLVFF présentent toutes deux une affinité pour les fibres Aβ. La constante de dissociation K_D obtenue pour les AGuIX@PEG@LPFFD est de l'ordre de 350 μ M alors que les AGuIX@PEG@KLVFF présentent un K_D de l'ordre de 400 μ M.

Bien que les constantes de dissociation obtenues soient de l'ordre de la centaine de μ molaire, c'est à dire caractéristiques d'une interaction relativement faible, ces résultats indiquent que les Nps fonctionnalisés par l'un ou l'autre peptide reconnaissent et interagissent avec les fibres Aβ. Dans le cas des nanoparticules mises en contact avec les fibres TTR, le signal (en R.U.) n'atteint pas de plateau, et dans ce cas, il n'est pas possible de modéliser les signaux obtenus par le modèle. Ces résultats indiquent que même à des concentrations en peptides atteignant plusieurs mM (correspondant à plusieurs dizaines de mM en Gd^{3+}), le signal résultant de l'interaction entre les fibres et les nanoparticules AGuIX@peptides ne sature pas et que l'interaction entre les nanoparticules fonctionnalisées par les peptides LPFFD ou KLVFF et les fibres Aβ est bien spécifique.

Le Biacore 2000[®] permet d'étudier l'affinité pour une cible d'analyte de faible poids moléculaire (>200 Da) [150], il est donc possible de réaliser la même expérience avec les peptides seuls, qui présentent une masse molaire d'environ 650 Da (Figure 0-8). La modélisation réalisée à partir des

moyennes des trois mesures révèle un K_D de l'ordre de 288 μM pour le peptide LPFFD et de l'ordre de 234 μM pour le KLVFF.

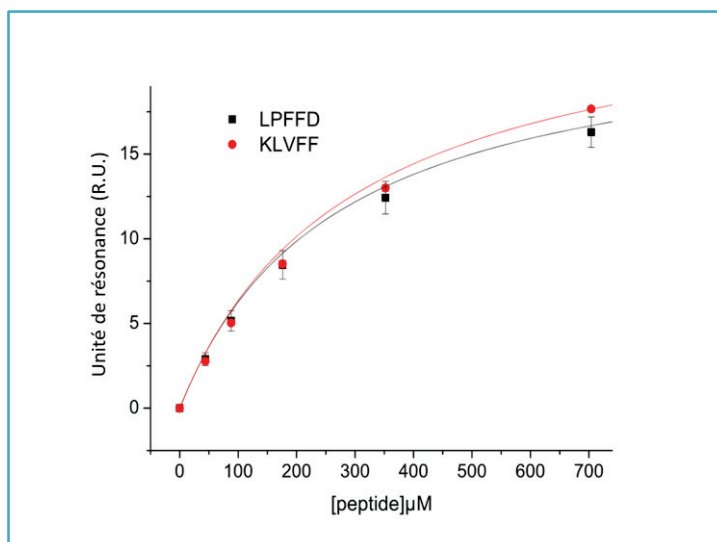


Figure 0-8 : Réponses (en R.U.) des peptides KLVFF et LPFFD à différentes concentrations sur la puce CM3 fonctionnalisée par 1200 R.U. de fibres $A\beta$, modélisées par le modèle d'association 1 :1 de Michaelis-Menten.

La constante de dissociation du peptide LPFFD obtenue expérimentalement est très proche de celle proposée par Liu *et al.* par SPR sur des monomères de protéines $A\beta(1-40)$ [148]. La constante de dissociation du KLVFF obtenue expérimentalement est quant à elle significativement plus basse que celle proposée par Cairo *et al.* par SPR avec des monomères de peptides $A\beta(10-35)$: $K_D = 1,4 \pm 0,9$ mM [145].

La perte d'affinité des peptides greffés, observée expérimentalement, peut s'expliquer par une éventuelle gêne stérique induite par les nanoparticules.

Ainsi, d'après les résultats de SPR et de fluorescence (voir publication) les nanoparticules AGuIX@PEG@Peptides interagissent spécifiquement *in vitro* avec les fibres amyloïdes $A\beta$. Suite à ces observations, cette affinité a été également caractérisée *ex vivo* sur des coupes de cerveau de souris modèle.

3.3.3.4. COMPORTEMENT EX VIVO DES AGuIX@PEG@PEPTIDES SUR DES COUPES DE CERVEAU DE SOURIS MODELE

Les expériences d'immunohistochimie ci-dessous ont été réalisées par Christel Marquette de l'équipe AFFOND du CEA de Grenoble sur des coupes de cerveau de souris modèles APPswe/PS1A246E/TTR(-/-), connues pour présenter des dépôts amyloïdes dans les régions du cortex et de l'hippocampe à l'âge de 10 mois [151] et des souris contrôle APPswe/ PS1A246E/TTR(+/-). Ces échantillons biologiques sont fournis par Maria Joao Saraiva, de l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire de Porto, (Portugal).

En plus des nanoparticules vectorisées par le peptide LPFFD ou KLVFF, des contrôles ont été effectués à l'aide des nanoparticules AGuIX@PEG@Cy5,5, et à l'aide de nanoparticules vectorisées par un fragment peptidique de 5 a.a. issu de la séquence de la protéine TTR. Toutes les nanoparticules ont été préalablement marquées par la cyanine 5,5. Les images de microscopie de fluorescence furent réalisées après 1h30 d'incubation des nanoparticules sur les coupes de cerveaux, puis rinçage par du tampon PBS. La présence des nanoparticules est détectée par imagerie de fluorescence dans le proche infrarouge ($\lambda_{exc}=620$ nm et $\lambda_{em}=642$ nm). Les noyaux cellulaires des sections de cerveau sont localisés à l'aide du colorant de Hoechst ($\lambda_{exc}=350$ nm et $\lambda_{em}=405$ nm).

Comme observé sur la Figure 0-9, les nanoparticules vectorisées par le peptide LPFFD (A) ou par le peptide KLVFF (C) sont bien présentes dans la zone de l'hippocampe des souris modèles. Au contraire, aucun signal de fluorescence significatif n'est observé dans cette zone chez souris saines (B et D).

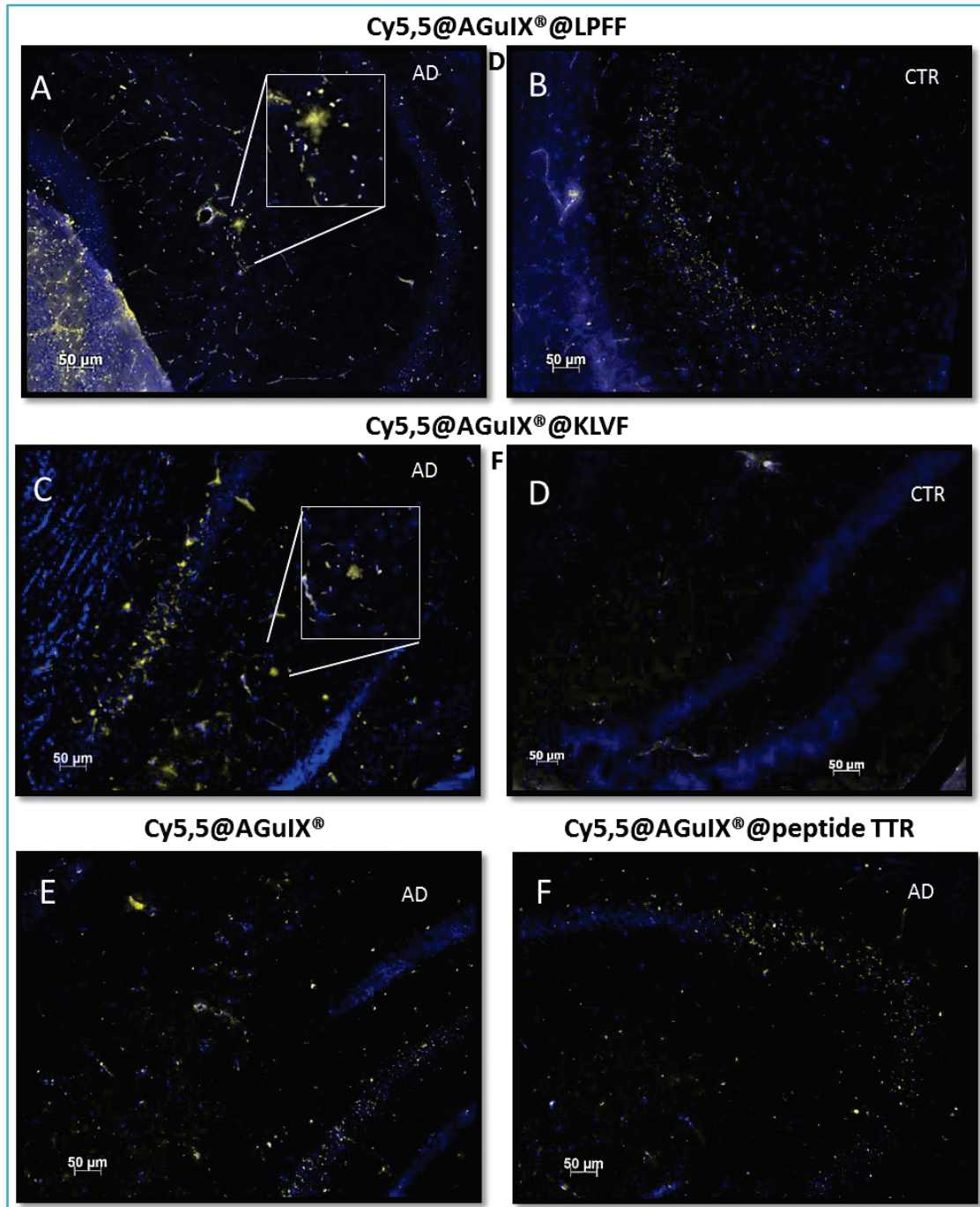


Figure 0-9 : Nanoparticules vectorisées par le peptide LPFFD ou KLVFF sur des coupes de cerveau de souris transgéniques APPswe/PS1A246/TTR (A, C, E, F) et de souris contrôle (B, D). Les fibres sont visualisées par microscopie de fluorescence après incubation en présence de AGuIX®@PEG@LPFFD@Cy5,5 (A, B) ; AGuIX®@PEG@KLVFF@Cy5,5 (C,D) ; et des contrôles AGuIX®@PEG@Cy5,5 (E) et AGuIX®@PEG@TTR@Cy5,5.

Comme vérifié par SPR, l'absence de signal non spécifique dû à la cyanine 5,5 est également observée sur une coupe de cerveau de souris modèle. Après incubation par les AGuIX®@PEG@Cy5,5, l'hippocampe ne présente pas de points de fluorescence marqués, comme cela est le cas pour les Nps vectorisées. Comme observé lors des expériences de SPR, ce fluorophore ne semble pas interagir avec les fibres. Un test d'interaction est également réalisé à partir de nanoparticules par un fragment

issu de la protéine amyloïdogénique TTR, participant à la structure en feuillets β . Le signal observé pour les nanoparticules fonctionnalisées par le peptide non issu de la protéine A β est très faible. Ce qui semble indiquer que l'interaction entre les nanoparticules fonctionnalisées par les peptides issus de la protéine A β semble bien due à une reconnaissance de séquence d'acides aminés.

Les nanoparticules ainsi développées interagissent spécifiquement avec les dépôts amyloïdes responsables de la maladie d'Alzheimer. De par leurs propriétés d'imagerie multimodale, ces Nps représentent donc un outil potentiel pour le diagnostic *in vivo* de la maladie d'Alzheimer.

Dans la partie suivante, nous nous intéresserons cette fois-ci à la vectorisation de ces nanoparticules *via* une molécule organique insaturée : le Pittsburgh Compound B.

3.4. VECTORISATION PAR LE PITTSBURGH COMPOUND B

3.4.1. THIOFLAVINE T & PITTSBURGH COMPOUND B

La Thioflavine T (ThT) a été décrite dès 1959 par Vassar et Culling comme marqueur fluorescent des fibres amyloïdes en histologie, dépassant les performances obtenues avec les marqueurs alors utilisés (le Rouge Congo et le Violet de Gentiane) [152]. Leurs travaux montrent que cette molécule permet de localiser sélectivement des dépôts amyloïdes et exhibe un rehaussement intense de sa fluorescence une fois liée aux fibres. Dans les années 1990, Naiki et LeVine [153] furent parmi les premiers à adapter ce marqueur d'histologie au suivi des cinétiques de formation et à la quantification *in vitro* des fibres amyloïdes [154].

Comme cité plus haut, le rehaussement de fluorescence de la ThT est un des critères définissant les fibres amyloïdes [119]. En effet, lorsque la molécule est non liée, ses cycles benzothiazole et aniline pivotent indépendamment autour de l'axe C-C (Figure 0-10.a) provoquant une auto-extinction de fluorescence et par conséquent une émission très faible [155]. A l'inverse, lorsque la ThT est fixée aux fibres amyloïdes, cette liberté de rotation est fortement limitée, le phénomène de « quenching » n'a pas lieu, et une intense fluorescence est observée (Figure 0-10.b).

Le mode de liaison entre la ThT et les fibres a été largement étudié au cours des dernières années.

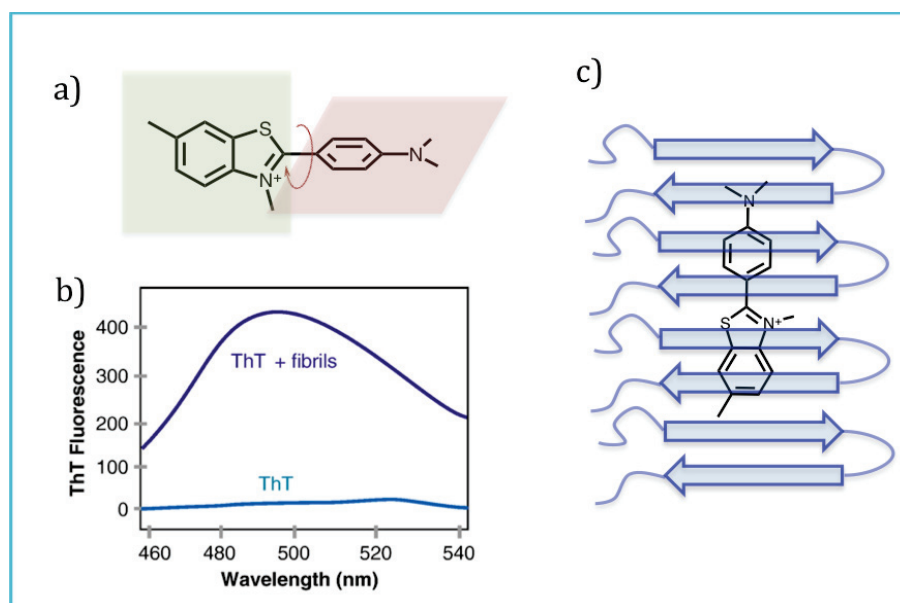


Figure 0-10: a) Structure de la Thioflavine T et représentation de la rotation entre les deux plans de la molécule lorsque celle-ci est non liée aux fibres. b) Augmentation significative de la fluorescence de la ThT lorsque celle-ci est fixée aux fibres (Adapté de Biancalana *et al.* [155]). c) La ThT se fixe aux fibres parallèlement à leur axe d'élongation.

L'hypothèse la plus largement admise est celle d'une liaison en « mode chaîne » où la molécule se fixe par liaison hydrophobe parallèlement à l'axe d'élongation des fibres (Figure 0-10.c) [156].

L'affinité de cette liaison, obtenue par mesure de fluorescence sur des fibres formées par le peptide A β (1-40) est de l'ordre du μ molaire avec une constante de dissociation K_D égale à 0,75 μ M [157].

De nombreux analogues de la ThT ont été synthétisés afin d'optimiser la liaison de la molécule aux fibres et/ou de mieux comprendre son mode de liaison [158]. Parmi tous ces dérivés, le Pittsburgh Compound B (Figure 0-11.a) s'est révélé particulièrement prometteur [159]. En effet, sa constante de dissociation K_D , obtenue par mesure de la radioactivité du ^{11}C sur des fibres formées *in vitro* à partir du peptide A β (1-40) est de 4,7 nM, soit deux ordres de grandeur de moins que la ThT [160]. Le composé, radiomarqué au ^{11}C , a ainsi été testé chez l'homme en 2004 par imagerie TEP dans une étude regroupant seize patients souffrant de la maladie d'Alzheimer à un stade avancé et neuf patients ne présentant pas de troubles cognitifs [161]. Cette technique d'imagerie très sensible a permis d'observer chez les malades une rétention significative du produit dans les zones connues pour être affectées par les fibres A β (cortex frontal, pariétal et temporal). A l'inverse, chez les individus sains, aucune rétention significative du produit n'a été observée dans ces zones (Figure 0-11.b).

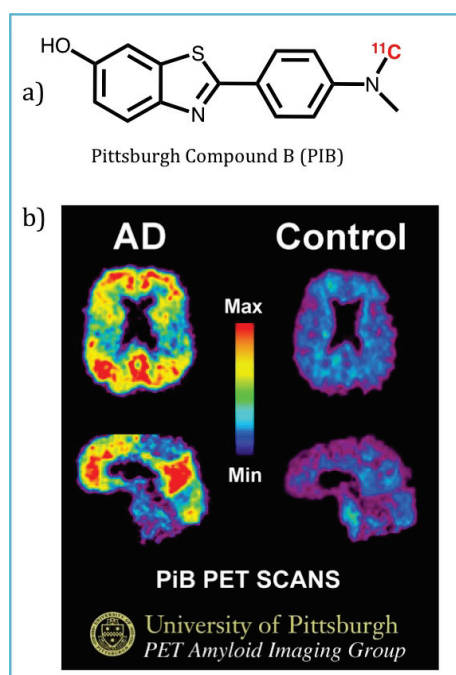


Figure 0-11: a) Structure du Pittsburgh Compound B; b) Images TEP réalisées sur l'humain (Patient malade et patient sain en contrôle) Adapté de Klunk et *al.* [160].

Ainsi, le Pittsburgh compound B est un nouveau traceur très prometteur de la maladie d'Alzheimer, pour un diagnostic par imagerie TEP. Ce produit a récemment été adapté par l'équipe d'Eva Toth comme agent de contraste en IRM et TEMP par couplage avec des complexes de DOTA(Gd) ou

DOTA(^{111}In) [162]–[164]. Le but étant de suivre ce produit *in vivo* par deux techniques d'imagerie en conjuguant la sensibilité de la TEMP avec la très haute résolution de l'IRM.

3.4.2. PARTIE EXPERIMENTALE

La partie suivante détaille la stratégie mise en place pour (i) fonctionnaliser les nanoparticules AGuIX par le Pittsburgh compound B, (ii) étudier l'affinité des Nps obtenues pour les fibres amyloïdes *in vitro*, par des techniques de fluorescence et de résonance plasmonique de surface, (iii) observer les interactions entre les nanoparticules vectorisées et les fibres amyloïdes *ex vivo* sur des coupes de cerveau de souris modèles.

Protocole

Les nanoparticules AGuIX@PEG-COOH lyophilisées sont redispersées à 500 mM en Gd^{3+} dans l'eau ultrapure, puis diluées par 10 dans du diéthylène glycol à 80°C, et enfin, par 2 dans du DMSO ($[\text{Gd}^{3+}] = 25 \text{ mM}$). Les fonctions acides carboxyliques des Nps sont activées par le couple EDC/PFP pendant 15 minutes (équivalents de EDC/PFP/Gd : 10/20/1). Le PIB à 200 mg.mL^{-1} est alors introduit dans la suspension de nanoparticules activées et le mélange réagit à température ambiante sous agitation magnétique pendant 6 heures (équivalents PIB/Gd : 1/1).

Les nanoparticules sont alors précipitées dans l'acétone et centrifugées à 2500 rpm pendant 5 minutes. Le surnageant contenant l'acétone, le PIB n'ayant pas réagi et le PFP est alors éliminé. Cette étape est répétée jusqu'à l'obtention d'un surnageant incolore. Après redispersion des Nps précipitées dans l'eau, la suspension est laissée dans un flacon ouvert à l'étuve à 40°C pendant 12 heures afin d'éliminer l'acétone restante. Enfin, la suspension de nanoparticules est purifiée sur membrane Vivaspin® de 5 kDa jusqu'à l'obtention d'un taux de purification de 10 000.

3.4.2.1. VALIDATION DE LA FONCTIONNALISATION DES AGuIX@PEG PAR LE PITTSBURGH COMPOUND B

Le Pittsburgh compound B est greffé aux nanoparticules AGuIX@PEG par une stratégie de fonctionnalisation de surface similaire à celle utilisée pour le couplage des peptides. De même que pour le greffage des peptides Beta-breaker, il s'agit des nanoparticules AGuIX fonctionnalisées par environ 5 chaînes de HOOC-PEG-COOH d'une masse molaire moyenne de 250 Da. Le couplage a lieu *via* formation d'une liaison amide entre l'amine du groupement aminophenyl du PIB et les fonctions acides carboxyliques présentes aux extrémités de chaînes de PEG.

Or, cette amine, en α du cycle benzénique, est très peu réactive [165]. En effet, la paire d'électrons célibataires présente sur l'atome d'azote est très proche du nuage électronique π du cycle phényle. Il se produit alors un recouvrement entre les orbitales. La paire d' e^- de l'azote est délocalisée et, dans ce cas, beaucoup moins réactive vis-à-vis d'un électrophile comme un ester activé (Figure 0-12).

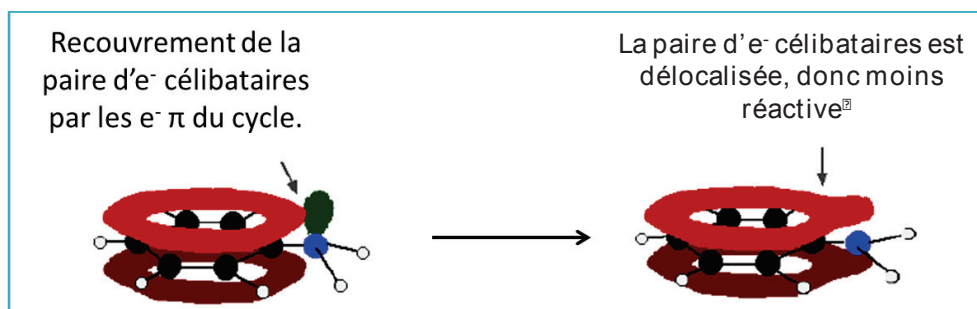


Figure 0-12 : Délocalisation électronique de la paire d' e^- célibataire de l'amine vers les $e^- \pi$ du cycle phényle.

Afin de pallier ce manque de réactivité, le couple d'activateurs choisi est le couple EDC/PFP. En effet, comme vu dans la partie §2.3.1.1.2, les esters de pentafluorophénol sont plus réactifs et moins sujets à l'hydrolyse que les esters de NHS.

3.4.2.1.1. CARACTERISATIONS QUALITATIVES

Les Nps AGuIX@PEG@PIB et les AGuIX@PEG de départ sont analysées à partir d'échantillons lyophilisés. Les nanoparticules fonctionnalisées par le composé PIB présentent un diamètre hydrodynamique plus important que les nanoparticules de départ : $6,5 \pm 1,5$ nm contre $4,3 \pm 1,0$ nm (Figure 3-25).

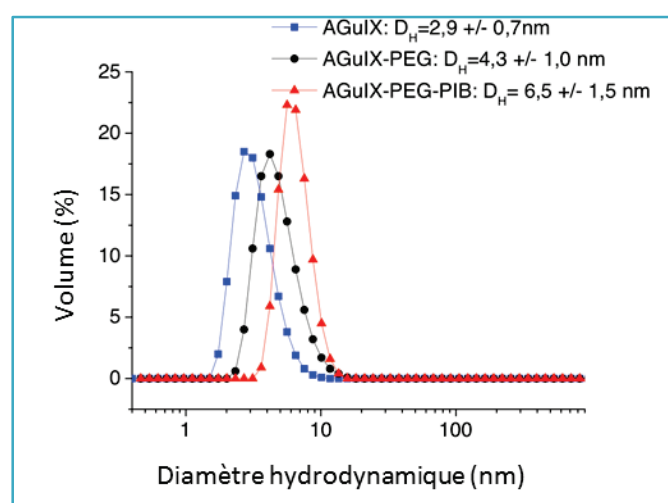


Figure 0-13 : Mesure du diamètre hydrodynamique des AGuIX, AGuIX@PEG et AGuIX@PEG@PIB (mesuré à 10 mM en Gd^{3+} avec un NanoZS $\lambda=633$ nm).

De plus, la relaxivité longitudinale des Nps augmente également de la valeur de $12,5 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ à $14,5 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ à 60 MHz à 37°C. Or, cette valeur est proportionnelle à la taille et à la rigidité des objets paramagnétiques (voir §1.4.3.1). Ainsi, les augmentations relatives de diamètre hydrodynamique et de relaxivité sont en accord avec une fonctionnalisation des nanoparticules par le vecteur PIB.

Les nanoparticules AGuIX et leurs dérivés présentent une bande d'absorption maximale centrée autour de 295 nm. Le PIB, quant à lui, est une molécule fluorescente présentant une intense couleur orange en solution dans le DMSO (Figure 0-14). Son maximum d'absorption est centré autour de 345 nm, pour une émission en fluorescence vers 420 nm. Des analyses HPLC ont été réalisées avec une détection par absorbance UV-Visible à ces deux longueurs d'ondes caractéristiques, et avec une détection par fluorescence aux longueurs d'ondes d'absorption et d'émission du PIB (Figure 0-15).

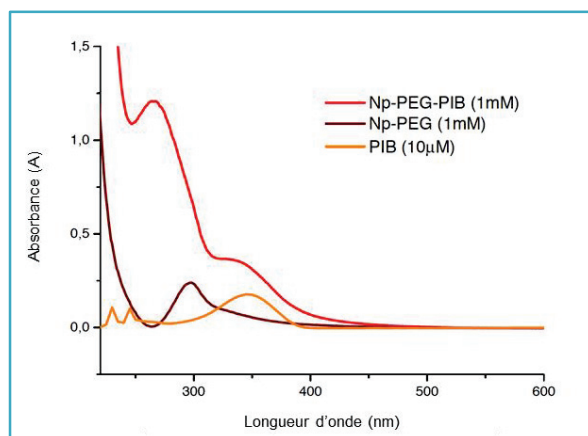


Figure 0-14 : Spectres d'absorption UV-Visible des AGuIX@PEG et AGuIX@PEG@PIB dans l'eau à 1 mM en Gd^{3+} et du PIB à 10 μM dans le DMSO.

Les chromatogrammes des différentes espèces testées sont tous normalisés par rapport à l'absorption maximale à 295 nm (fixée arbitrairement à 100 %). La comparaison des chromatogrammes à 295 nm, soit le maximum d'absorption des AGuIX, indique que les Nps fonctionnalisées présentent un temps de rétention t_r ($t_r = 18,2 \text{ min}$) plus élevé que celui des Nps de départ ($t_r = 17,2 \text{ min}$). Ce décalage de temps de rétention, sur une colonne apolaire, est en accord avec une fonctionnalisation des Nps par une molécule hydrophobe.

De plus, le ratio entre les absorptions à 295 nm et 350 nm change significativement après fonctionnalisation, avec une contribution majeure de l'absorption à 350 nm.

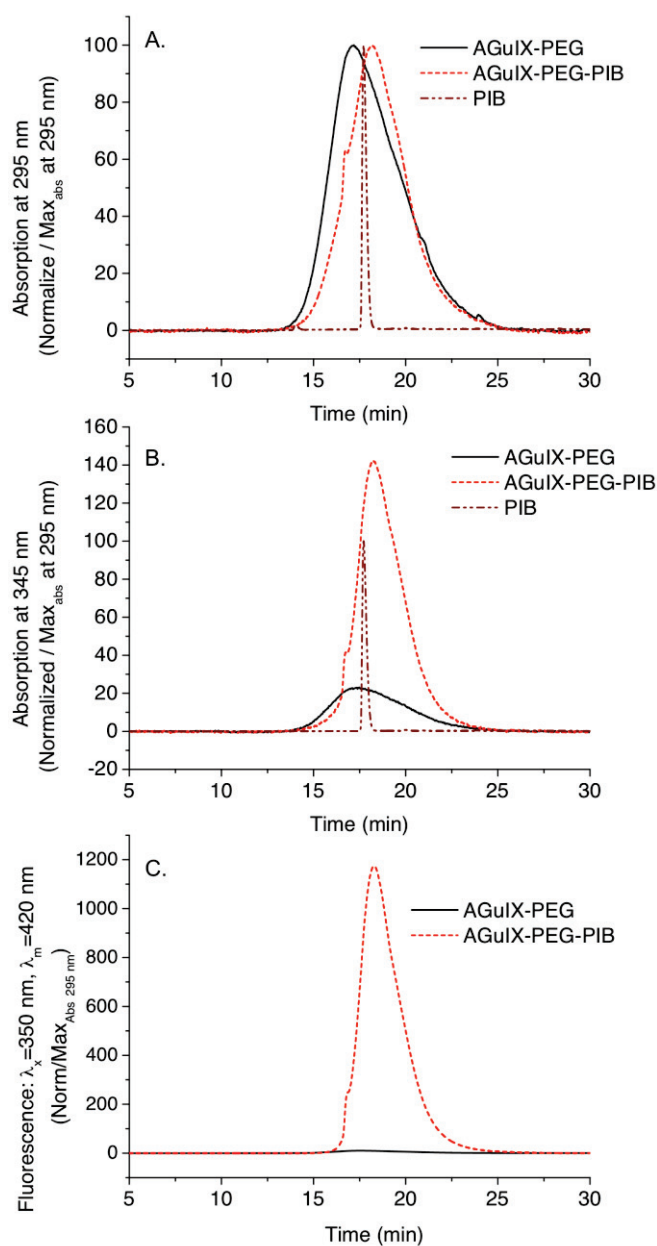


Figure 0-15: Chromatogrammes des nanoparticules AGuIX@PEG, AGuIX@PEG@PIB et du PIB seul aux différentes longueurs d'ondes spécifiques des composés. Tous les chromatogrammes sont normalisés par rapport à l'absorption maximale du composé à 295 nm.

Enfin, pour les AGuIX@PEG@PIB, les chromatogrammes obtenus par détection à 350 nm et en fluorescence, aux longueurs d'ondes caractéristiques du PIB, montrent le même temps de rétention et la même distribution que celui à 295 nm, caractéristique des Nps. Ces observations sont en accord et montrent que le PIB est bien greffé aux nanoparticules AGuIX@PEG.

3.4.2.1.2. QUANTIFICATION DU PITTSBURGH COMPOUND B

3.4.2.1.2.1. Via les propriétés de luminescence du PIB

Le nombre de molécules de PIB greffées aux Nps est caractérisé par absorption UV-Visible et par fluorescence. Or, Voropai *et al.* et Maskevich *et al.* ont montré que les propriétés de luminescence de la Thioflavine T (ThT), dont le PIB est un dérivé, dépendaient fortement de l'environnement de la molécule [166]–[169], (Tableau 0-5). Certaines de leurs observations sont répertoriées dans le tableau suivant, où ϵ ($\lambda_{\text{abs, max}}$) ($\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) est le coefficient d'extinction molaire au maximum d'absorption $\lambda_{\text{abs, max}}$; $\lambda_{\text{em, max}}$ la longueur d'onde d'émission de fluorescence maximale et q le rendement quantique de fluorescence (%).

Tableau 0-5 : Influence du solvant sur les propriétés de luminescence de la Thioflavine T, adapté de [166]–[169].

Solvant	Indice de polarité[170]	$\epsilon(\lambda_{\text{abs, max}})$ $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$	$\lambda_{\text{abs, max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em, max}}$ (nm)	q (%)
Eau	9,0	36 000	412	493	0,0003
Diméthylsulfoxyde	7,2	-	418	503	0,0009
Ethanol	5,2	26 620	416	490	0,0012

De plus, le couplage covalent de l'amine primaire en α du cycle phényl induit une modification de la répartition électronique de la molécule et par conséquent une modification de ces propriétés de luminescence. Toutefois, contrairement à la ThT, le PIB ne possède pas de charge et est particulièrement hydrophobe. Ainsi, l'étude de l'influence de la pegylation du PIB a été étudiée dans l'éthanol, qui permet de disperser à la fois cette molécule et les Nps hydrophiles.

Protocole de pegylation du PIB

La solution de HOOC-PEG-COOH ($M_n=250 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) à 50 mM dans l'éthanol est activée par 20 équivalents de EDC et 20 équivalents de PFP. Ce mélange est ensuite ajouté en large excès (ratio molaire de PEG/PIB de 10 :1) à une solution de PIB à 5 mM dans l'éthanol (Figure 0-16). Etant donné que les molécules de EDC et PFP n'absorbent ni n'émettent dans la même gamme de longueur que le PIB, les études suivantes sont réalisées sans purification préalable.

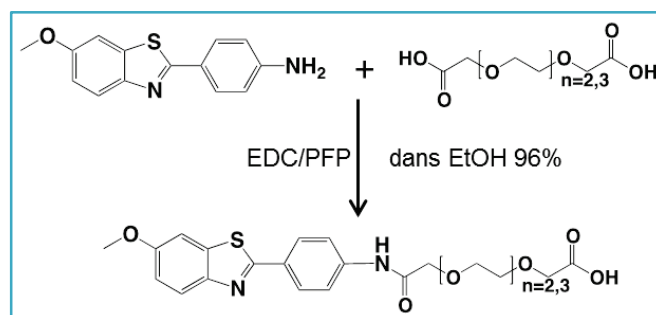


Figure 0-16 : Schéma réactionnel de la pegylation du Pittsburgh compound B

Le PIB seul dans le DMSO et l'éthanol, et le PEG-PIB dans l'éthanol, sont analysés en absorption à l'aide d'un spectrophotomètre Varian® Cary 50 et en fluorescence à l'aide d'un spectromètre Varian® Cary Eclipse aux concentrations de 0,5 ; 1 ; 2,5 ; 5 et 10 μM . Les valeurs de l'absorbance au maximum d'absorption et l'intensité de fluorescence au maximum d'émission de chacun des échantillons sont ensuite tracées en fonction de la concentration en PIB². Les différentes caractéristiques obtenues : coefficient d'extinction molaire, longueur d'onde d'émission et d'excitation, sont reportées dans le tableau 3—8.

Résultats

Il apparaît que le solvant influe sur la longueur d'onde maximale d'absorption et le coefficient d'extinction molaire du composé. Un décalage de 5 nm est observé entre les spectres d'absorption du PIB dans le DMSO (350 nm) et dans l'éthanol (345 nm) alors que le $\epsilon(\lambda_{\text{abs, max}})$ du PIB dans le DMSO est deux fois plus faible que celui observé dans l'éthanol (Tableau 0-6). La conjugaison de l'amine primaire du PIB par une chaîne de PEG décale la $\lambda_{\text{abs, max}}$ vers le bleu (338 nm), mais ne semble pas modifier significativement le $\epsilon(\lambda_{\text{abs, max}})$ du composé.

Tableau 0-6 : Influence du solvant et de la conjugaison sur les propriétés de luminescence du PIB

	Solvant	$\lambda_{\text{abs, max}}$ (nm)	$\epsilon(\lambda_{\text{abs, max}})$ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	$\lambda_{\text{em, max}}$ (nm)
PIB	DMSO	350	16000 (350 nm)	420
PIB	EtOH	345	30000 (345 nm)	413
PIB-PEG	EtOH	338	35000 (338 nm)	401

Les longueurs d'ondes et les intensités de fluorescence varient également en fonction du solvant (Figure 0-17). Comme observé pour la ThT, le composé émet davantage de lumière dans l'éthanol

² Annexe 2: Droites étalons de fluorescence et d'absorption du PIB en fonction du solvant et de la pegylation.

que dans le DMSO [167]. De plus, il apparaît que la conjugaison du PIB avec une chaîne pegylée diminue l'intensité de fluorescence du produit.

Ainsi, le taux de greffage du PIB sur les nanoparticules AGuIX@PEG-COOH est déterminé à partir des droites étalons réalisées dans l'éthanol sur le composé PEG-PIB. Les rendements de couplage, calculés à partir des mesures d'absorption et de fluorescence, sont en accord et indiquent que 1 équivalent de PIB est obtenu pour 50 équivalents de Gd^{3+} .

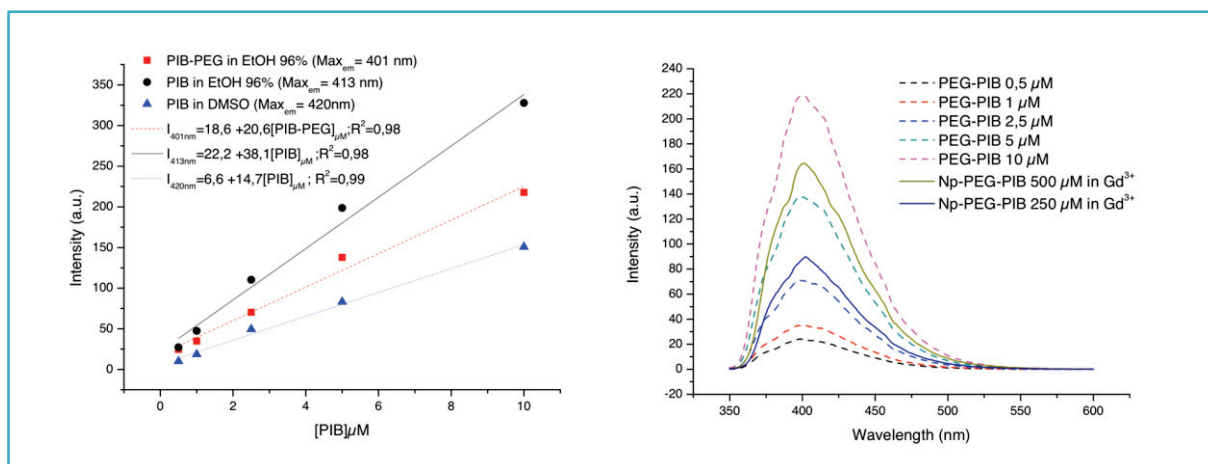


Figure 0-17 : Etalonnage en fluorescence du PIB dans différentes conditions (gauche) ; et spectres d'émission des PEG-PIB et des AGuIX@PEG@PIB dans l'éthanol.

3.4.2.1.2.2. Proposition d'une formule brute

Une formule brute peut être proposée à partir des résultats d'analyse élémentaire et du dosage des amines libres. Le raisonnement mis en jeu pour les calculs est explicité dans les sections §2.2.1 et §3.3.3.2.2.

Tableau 0-7 : Comparaison des pourcentages massiques de chaque élément, obtenus expérimentalement ou calculés à partir de la formule brute.

AGuIX-PEG-PIB		
	Exp.	Theo.
%Gd	11,30	11,67
%Si	8,61	8,90
%N	8,90	8,51
%C	30,98	30,76

La formule brute obtenue théoriquement présente moins de 0,5% d'erreur absolue par rapport aux résultats expérimentaux.



Cette formule est en accord avec la quantification du PIB réalisée par luminescence ($0,02\text{ PIB/Gd}^{3+}$) et le dosage des amines libres par le TNBS ($2,8\text{ NH}_2/\text{Gd}^{3+}$). Bien que le rendement de greffage du PIB soit relativement faible, le PIB a bien été greffé de manière covalente sur environ une particule sur cinq.

3.4.2.2. MESURE DE L’AFFINITE DU PIB ET DES AGuIX@PIB PAR FLUORESCENCE

L’affinité entre le PIB ou les AGuIX@PIB a été évaluée par l’équipe AFFOND du CEA de Grenoble grâce à des expériences de partition (Figure 0-19), détaillées ci-dessous (Figure 0-18).

Protocole :

Les fibres (i.e. A β , TTR ou IAPP) à $20\text{ }\mu\text{M}$ en monomère sont incubées avec des concentrations croissantes de PIB ou AGuIX@PIB allant de $0,01\text{ }\mu\text{M}$ à $4\text{ }\mu\text{M}$ pendant 60 minutes à température ambiante dans $500\text{ }\mu\text{L}$ de tampon. Dans le cas de l’analyse des interactions des AGuIX@PIB, 3 mM en Gd^{3+} de nanoparticules AGuIX « nues » sont ajoutés au milieu afin de prévenir la dégradation du réseau de polysiloxane des nanoparticules fonctionnalisées. Une première mesure de fluorescence est effectuée sur le mélange aux longueurs d’ondes d’excitation et d’émission du PIB ($\lambda_{\text{excitation}} = 350\text{ nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 419\text{ nm}$). La mixture est ensuite centrifugée à $14\text{ }000\text{ rpm}$ pendant 25 minutes à 25°C pour obtenir un culot (ou « pellet »), contenant les fibres et les analytes liés aux fibres et un surnageant contenant les analytes non liés aux fibres. Enfin, le culot est séparé du surnageant et redispersé dans $500\text{ }\mu\text{L}$ de tampon. Une seconde mesure de fluorescence est alors réalisée sur le culot redispersé et le surnageant respectivement.

Les spectres sont réalisés dans une cuve en quartz de largeur d'1 cm à l'aide d'un spectrophotomètre JASCO J-815 CD en utilisant un temps de réponse d'une seconde, une vitesse de scan de 100 nm.min⁻¹, et en réglant les fentes d'excitation et d'émission à 5 nm et 10 nm respectivement. ces spectres ont été accumulés 3 fois à 350 nm (excitation) et de 380 nm à 460 nm (émission) à 25 °C, avec un voltage de 300 V pour les mesures du PIB et un voltage de 200 V pour les AGuIX@PIB.

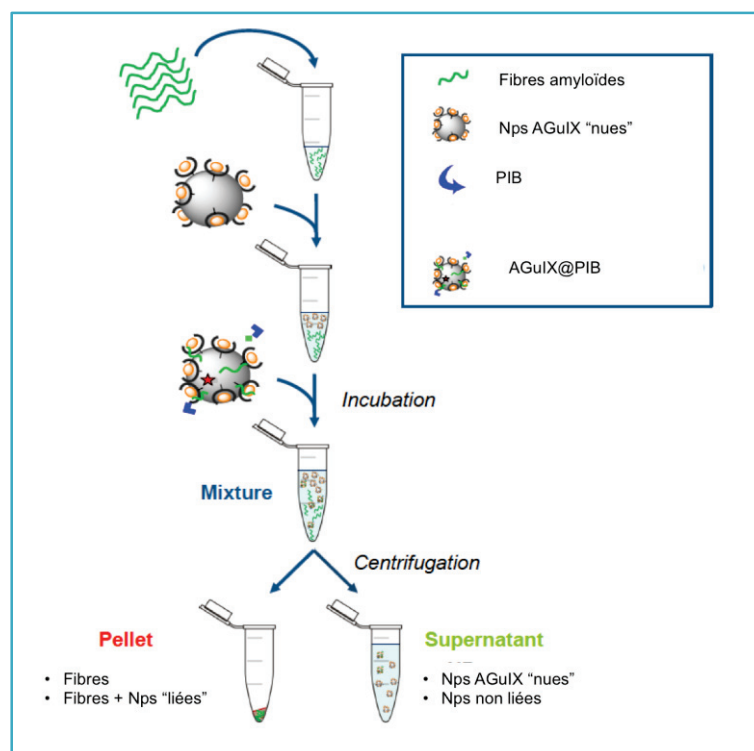


Figure 0-18 : Représentation schématique des différentes étapes permettant la réalisation des partition in vitro entre les différentes fibres amyloïdes et le PIB ou les AGuIX@PIB (figure réalisée par Jonathan Pansieri).

La valeur des intensités d'émission à 419 nm est alors tracée en fonction de la concentration en PIB pour être modélisé par le modèle d'association 1:1 de Michealis-Menten (Figure 0-19) selon la formule :

$$I_{(419nm)} = \frac{I_{(419nm,max)}}{(1 + \frac{K_D}{[PIB]})}$$

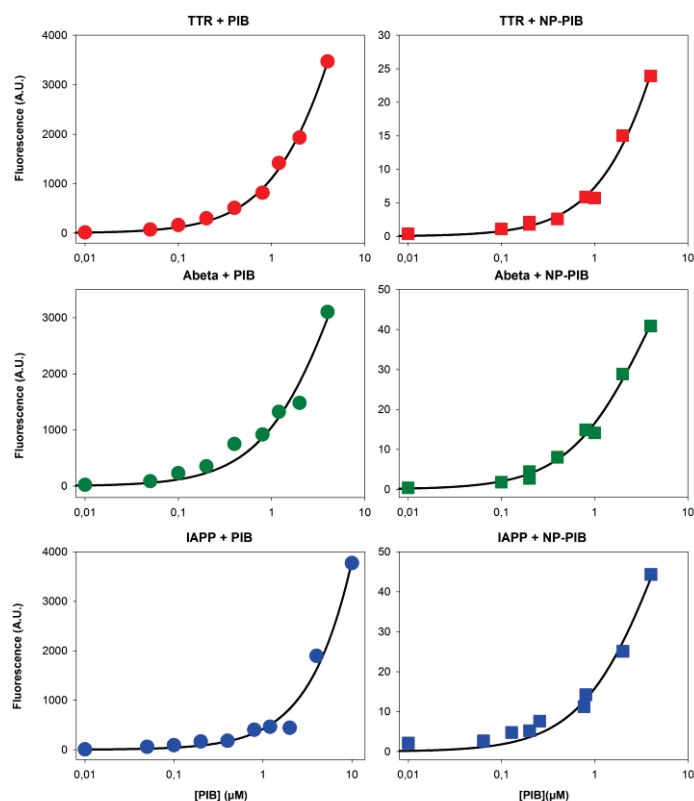


Figure 0-19 : Partitions *in vitro*. Etude de la liaison entre le PIB ou les AGuIX@PIB avec les différents types de fibres. L'intensité de fluorescence du PIB est tracée en fonction de la concentration en PIB puis modélisée à l'aide du modèle de Michaelis.

Tableau 0-8 : Constantes de dissociations du PIB et des AGuIX@PIB pour les fibres A β , TTR et IAPP, obtenues par fluorescence.

Type de fibres	A β	IAPP	TTR
K_D (M) du PIB	$6 \cdot 10^{-6}$	$20 \cdot 10^{-6}$	$10 \cdot 10^{-6}$
K_D (M) des AGuIX@PIB	$15 \cdot 10^{-6}$	$21 \cdot 10^{-6}$	$57 \cdot 10^{-6}$

Les constantes de dissociation K_D du PIB pour chacun des types de fibres est dans le même ordre de grandeur, soit 6 μ M pour les fibres A β , 10 μ M pour les fibres TTR et 20 μ M pour les fibres IAPP.

Une fois lié aux nanoparticules AGuIX, le PIB conserve bien son affinité pour les différentes fibres amyloïdes. Les valeurs des constantes de dissociation sont toutefois légèrement plus élevées que pour le PIB seul, soit 15 μ M pour les fibres A β , 21 μ M pour les fibres IAPP et jusqu'à 57 μ M pour les fibres TTR. Cette diminution relative de l'affinité peut s'expliquer par une éventuelle gêne stérique induite par le squelette des nanoparticules AGuIX.

3.4.2.3. MESURE DE L’AFFINITE DES AGuIX@PEG@PIB POUR LES FIBRES ABETA PAR RESONANCE PLASMONIQUE DE SURFACE

L’étude de la liaison entre les AGuIX@PEG@PIB et les fibres A β a également été réalisée à l’aide du Biacore® 2000 sur une puce CM3 fonctionnalisée par 1200 R.U. de fibres A β . Les nanoparticules vectorisées sont testées à différentes concentrations afin de déterminer leur constante de dissociation pour les fibres amyloïdes. Après cinq cycles d’échauffement de l’appareil réalisés avec du tampon HBS-P, chaque échantillon de nanoparticules vectorisées est injecté 3 fois dans l’appareil à des concentrations en PIB allant de 0,1 à μ M à 32 μ M. Les moyennes de chacune des 3 mesures (en R.U.) sont enfin tracées en fonction de la concentration en PIB injecté et modélisées avec le modèle de Michaelis-Menten d’ordre 1.

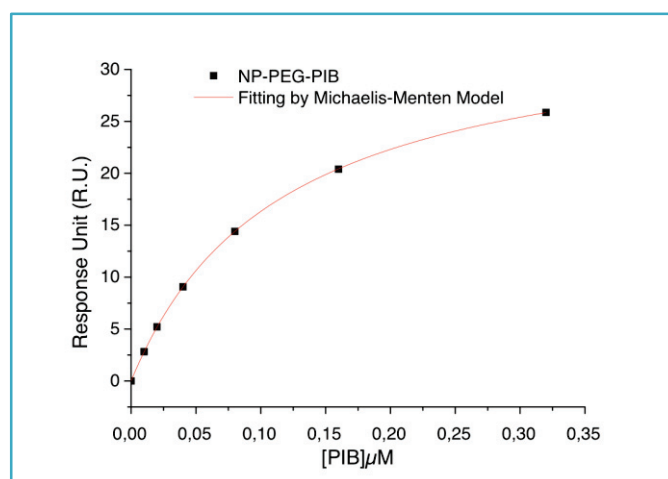


Figure 0-20: Moyenne des réponses (en R.U.) des AGuIX@PEG@PIB sur les fibres ABeta, modélisées par le modèle d’association de Michaelis-Menten.

Les nanoparticules AGuIX@PEG@PIB présentent ainsi une constante de dissociation K_D de l’ordre de 8,6 μ M en PIB. Ces valeurs sont dans le même ordre de grandeur que le K_D obtenu précédemment par mesure de fluorescence, soit 15 μ M.

Les tests d’interactions réalisés sur les canaux fonctionnalisés par les fibres IAPP ou TTR ont donné lieu à des sensorgrammes particulièrement bruités. De plus, malgré l’injection de la solution de régénération, un mauvais retour à la ligne de base a été obtenu. Ainsi, les résultats concernant l’interaction des nanoparticules AGuIX@PEG@PIB avec les fibres TTR ou IAPP n’étaient malheureusement pas exploitables. De plus, le PIB seul, de par son hydrophobicité, ne peut être dispersé que dans un solvant organique (ex : DMSO). Or, les mesures de SPR reposent sur les modifications d’indice de réfraction du milieu et l’introduction de ce type de solvant dans l’appareil induit des biais importants dans le signal obtenu. Ainsi, seule l’interaction entre les fibres A β et les Nps a pu être analysée en Biacore®. Ces études ont été réalisées au CEA de Grenoble par l’équipe

AFFOND afin de déterminer les constantes de dissociation de ces interactions par mesure de fluorescence et sont répertoriées dans le tableau suivant. Le détail de ces expériences est explicité dans la publication.

Tableau 0-9 : Constantes de dissociations du PIB et des Nps AGuIX@PEG@PIB pour les fibres A β , TTR et IAPP, mesuré par fluorescence du PIB.

Type de fibres	A β	IAPP	TTR
K _D (M) du PIB	6.10 ⁻⁶	20.10 ⁻⁶	10.10 ⁻⁶
K _D (M) des AGuIX-PEG-PIB	15.10 ⁻⁶	21.10 ⁻⁶	57.10 ⁻⁶

Par cette méthode, il apparaît que le PIB reconnaît bien les trois types de fibres, quelque soit la protéine à l'origine de celles-ci. Les K_D de cette molécule pour chacune des fibres est dans le même ordre de grandeur (5-20 μ M), caractéristique d'une interaction moyenne entre une cible et un ligand. Une fois greffé aux Nps, le PIB conserve sa reconnaissance pour les fibres. Les légères pertes d'affinité observées peuvent être dues à une éventuelle gêne stérique induite par les Nps.

3.4.2.4. TEST DE L'AFFINITE *EX VIVO* DES AGuIX@PEG@PIB SUR DES COUPES DE CERVEAU DE SOURIS MODELE

Les expériences d'immunohistochimie ci-dessous ont été réalisées par Christel Marquette de l'équipe AFFOND du CEA de Grenoble sur des coupes de cerveau de souris modèle Alzheimer APP/PSE1 et souris modèle polyneuropathie amyloïde familiale (VM30-TTR), connues pour présenter des dépôts amyloïdes à l'âge de 10 mois. Ces échantillons biologiques sont fournis par Maria Joao Saraiva, de l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire de Porto, (Portugal). Les images obtenues en microscopie de fluorescence sont répertoriées dans la (Figure 0-21):

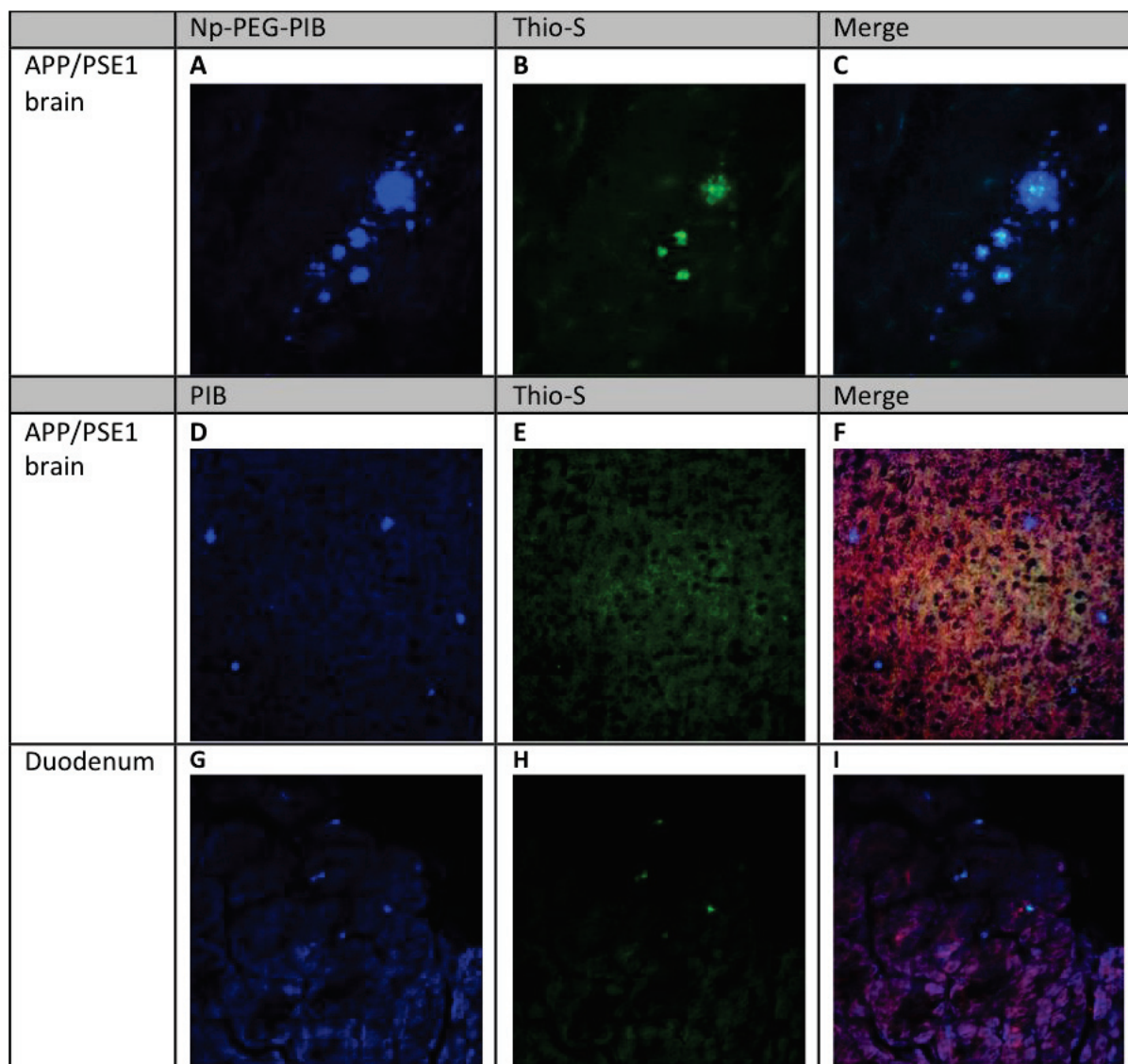


Figure 0-21: Détection des dépôts amyloïdes sur des coupes de cerveau AD (A-F) et des coupes de duodénum (G-I) de souris V30M-TTR après incubation par du PIB (D-I) ou des nanoparticules AGuiX@PEG@PIB (A-C).

Le PIB, connu pour être un marqueur spécifique des dépôts amyloïdes présente une fluorescence localisée dans le cortex des souris modèles Alzheimer (D-F) et dans le duodénum des souris modèles TTR (G-I). La co-localisation de ce signal avec celui de la Thioflavine S (Th S) permet d'identifier ces régions comme dépôts amyloïdes dus à l'accumulation de protéines A β et TTR respectivement (E-F). Des images complémentaires réalisées sur animal sain ne présentent quant à elles aucune fluorescence caractéristique.

Comme illustré ci-dessus, une fois greffé aux nanoparticules, le PIB présente également une intense fluorescence co-localisée avec le signal de la Th S. Ces résultats prouvent la capacité des Nps

AGuIX@PEG@PIB à reconnaître *ex-vivo* des dépôts amyloïdes. Ainsi, de par sa constante de dissociation satisfaisante et du succès de la reconnaissance des fibres en histologie, ces nanoparticules peuvent être envisagées comme agent d'imagerie multimodal (IRM et fluorescence) général des pathologies amyloïdes.

3.5. VECTORISATION PAR LE NANOBODY B10AP

3.5.1. NANOBODIES

Les nanobodies sont les plus petits sites de reconnaissance d'antigène naturels. D'une taille d'environ 15 kDa et d'un nombre moyen de 130 acides aminés, ils sont issus de fragments d'anticorps de camélidés (chameau, dromadaires et lamas) [171], [172]. En effet, comme cité dans la section §1.3.3, certains anticorps des camélidés ne possèdent pas de chaînes légères. Leur zone variable ou V_HH peut ainsi être isolée pour obtenir un *nanobody* (Figure 0-22).

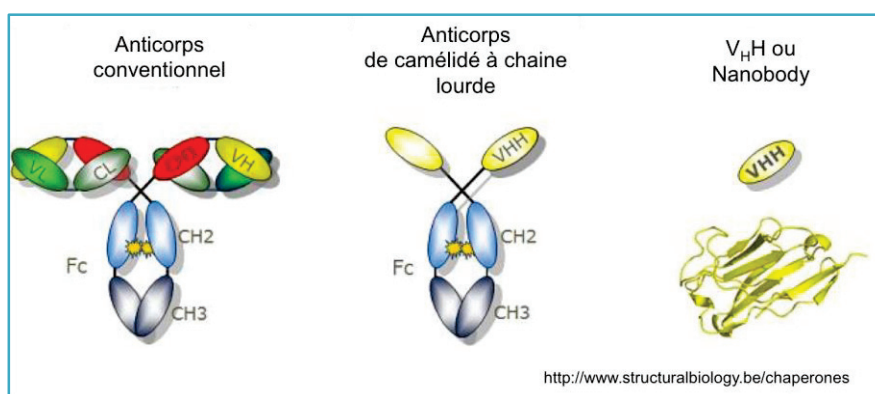


Figure 0-22: Représentation schématique de la différence entre un anticorps conventionnel et un anticorps de caméléidé sans chaîne légère, et le fragment VHH (ou Nanobody).

Ces fragments d'anticorps présentent de nombreux avantages par rapport aux anticorps ou fragments d'anticorps conventionnels [173],[174].

Tout d'abord, la stabilité des nanobodies est particulièrement élevée. Il est possible de les conserver plusieurs mois à 4°C et plusieurs années à -20°C, mais également de les incubier à 37°C jusqu'à une semaine ou de les lyophiliser, sans altérer leur affinité pour leur cible [175]. De plus, contrairement aux anticorps conventionnels, leur stabilité et leur solubilité permettent de les concentrer jusqu'à 1 - 15 mg.mL⁻¹ [174]. Ils présentent une très grande affinité pour leurs antigènes, en général de l'ordre du nM, couplée à une exceptionnelle spécificité [171], [172]. Enfin, si les anticorps conventionnels ne traversent pas ou très peu la barrière hémato-encéphalique (seulement 0,1-0,2% de la dose injectée se retrouve dans le cerveau [176]), certains nanobodies ont montré la propriété de passer à travers cette membrane [177],[178]. Ainsi, de par ces nombreuses propriétés, les nanobodies représentent un outil unique pour cibler les fibres amyloïdes et étudier leurs mécanismes de développement *in vivo*.

Dans ce cadre, plusieurs nanobodies ont été développés afin de cibler spécifiquement certaines espèces amyloïdes (monomères, oligomères et /ou fibres). Le nanobody B10 (Figure 0-23) a par

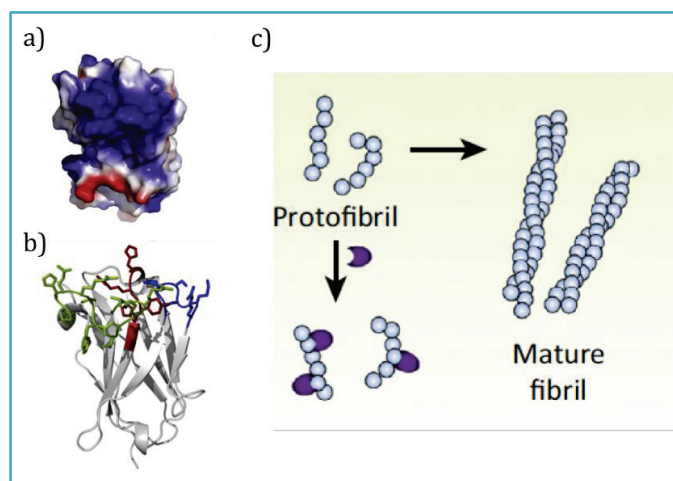


Figure 0-23 : a) Représentation de la zone basique de liaison à l'antigène de B10. b) Modèle de B10 ; c) Le B10 permet de stabiliser les protofilaments et d'éviter leur réarrangement en fibres. Adapté de Haupt *et al.* [179].

exemple été développé par phage display pour cibler les protofilaments et fibres amyloïdes de la protéine A β (1-40) [9]. Son affinité (K_D), déterminée par Résonance Plasmonique de Surface est de 475 ± 54 nM. Afin de faciliter sa détection en immunohistochimie et en immunotransfert, le nanobody B10 peut être fusionné génétiquement avec la phosphatase alcaline (AP) de *E. Coli* pour former la protéine dimère B10Ap. Cette entité présente cette fois-ci une constante de dissociation de $7,22 \pm 0,97$ nM pour les fibres A β (1-40). Liée ou non à la phosphatase alcaline, le B10 ne se fixe pas ou peu aux monomères, oligomères ou fibres dénaturées, ce qui indique que ce nanobody est bien spécifique des formes protofilaments ou fibres de la protéine A β . Le mode de liaison du nanobody, qui possède une zone très basique, se produit par interactions électrostatiques avec les charges positives de ces fibres [179] , [180].

Lorsqu'il se fixe sur les protofilaments, B10Ap présente également la propriété de les stabiliser et d'empêcher leur évolution en fibres amyloïde matures. Enfin, le B10 et B10AP permettent de cibler d'autres types d'amyloïdes que les A β , notamment celles issues des protéines d'insuline, de glucagon, et des chaînes légères de l'immunoglobine (AL).

3.5.2. GREFFAGE DU NANOBODY SUR LES NANOPARTICULES AGuIX

Le B10Ap présente une masse molaire de 63.5 kDa et un coefficient d'extinction molaire à 279 nm de $64\,685\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Il est greffé aux nanoparticules AGuIX@DOTA_{libres7%} selon le protocole suivant (Figure 0-24) :

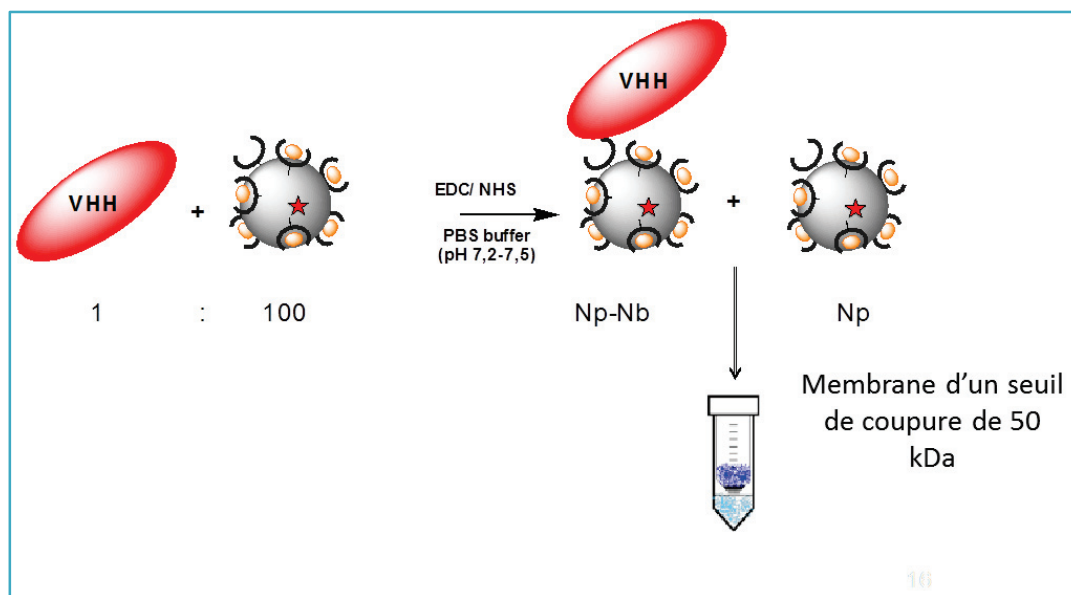


Figure 0-24 : Stratégie de couplage du nanobody B10Ap sur les nanoparticules AGuIX@DOTA_{libres}7%

Activation des fonctions acides carboxyliques :

Redisperser 50 μmoles en Gd^{3+} de nanoparticules AGuIX@DOTA_{libres}@Cy5.5 dans 500 μL d'eau ultrapure et attendre environ une heure pour la redispersion complète des Nps. Ajouter 100 mg d'EDC et 150 mg de NHS. Incuber pendant environ 15 minutes à température ambiante sous agitation magnétique.

Couplage aux nanobodies par formation d'une liaison amide :

Ajouter un large excès (x100) de nanoparticules activées à la suspension de nanobodies à 0.65 mg.mL^{-1} dans le tampon PBS. Ajouter des nanoparticules non activées pour atteindre une concentration en Gd^{3+} de 10 mM, puis incuber pendant environ 30 minutes.

Purification des nanoparticules en excès :

Les nanoparticules en excès sont purifiées par filtration tangentielle sur une membrane Vivaspin® d'un seuil de coupure de 50 kDa, par répétition de cycles de centrifugation à 2500 rpm et en complétant le volume avec du tampon PBS. Les nanoparticules-nanobodies obtenues sont ensuite lyophilisées en différents aliquots et conservées à l'abri de la lumière.

3.5.3. CARACTERISATIONS PHYSICOCHIMIQUES

Pour les différentes caractérisations suivantes, les nanoparticules-nanobodies lyophilisées sont redispersées à 0,6 mM en Gd^{3+} dans du tampon PBS. La concentration en gadolinium a été obtenue par mesure de spectroscopie par torche plasma (ICP-OES) réalisé au laboratoire, en comparaison avec une gamme étalon de gadolinium commerciale.

3.5.3.1. AUGMENTATION DU DIAMETRE HYDRODYNAMIQUE

Tout d'abord, les mesures de granulométrie réalisées en DLS (Figure 0-25) montrent que le B10Ap

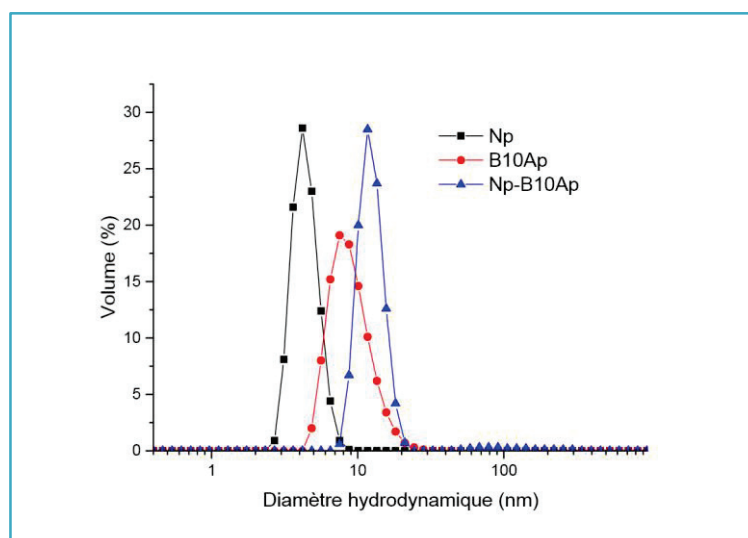


Figure 0-25: Diamètre hydrodynamique des nanoparticules (Np), du nanobody B10AP (Nb) et du conjugué Np-Nb, réalisé avec un granulomètre NanoZS ($\lambda=633$ nm)

présente un diamètre hydrodynamique de $9,2 \pm 2,9$ nm et les nanoparticules AGuIX@DOTA_{libres}7% un diamètre hydrodynamique de $4,2 \pm 0,7$ nm. En comparaison, le conjugué Np-Nb montre une augmentation sensible du diamètre hydrodynamique avec une valeur de $13,9 \pm 2,6$ nm.

3.5.3.2. ESTIMATION DE LA CONCENTRATION EN B10AP PAR ABSORBANCE

Dans un premier temps, la concentration en nanobody B10Ap est estimée par mesure de l'absorption UV-Visible. Or, les spectres d'absorption des nanoparticules et du B10AP se

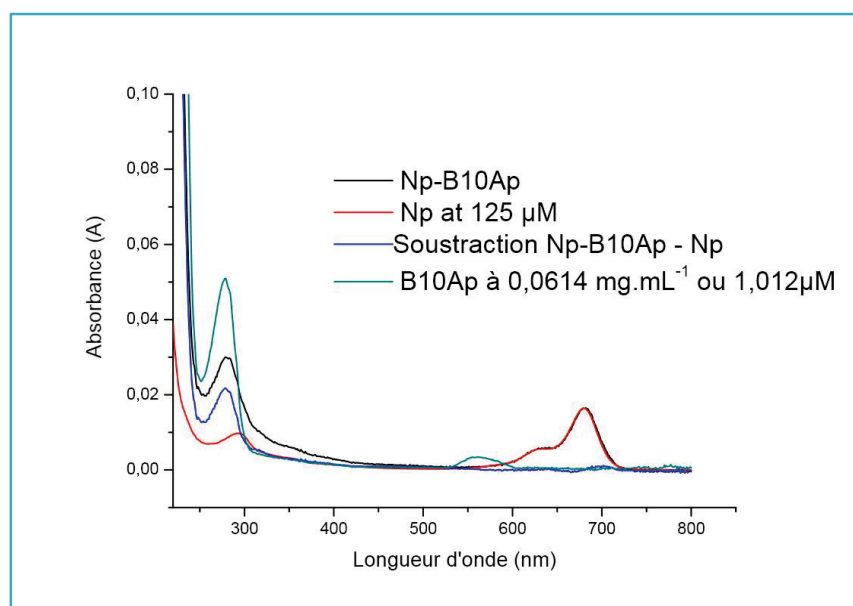


Figure 0-26: Spectres d'absorption des différentes espèces

superposent. En connaissant la concentration en nanoparticules, il est possible de soustraire la contribution de celles-ci à 279 nm afin d'en déduire l'absorbance uniquement due au nanobody.

A partir de cette absorbance, il est ensuite aisé d'estimer la concentration en nanobody d'après la loi de Beer-Lambert : ($\epsilon(279 \text{ nm}) = 64\,685 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) :

$$A(\lambda) = \epsilon(\lambda) \cdot l \cdot c$$

où $A(\lambda)$ est la valeur de l'absorbance à la longueur d'onde λ , l la longueur du trajet optique dans la solution (cm) et c la concentration en analyte. D'après ces analyses, et en formulant l'hypothèse qu'environ 10 ligands DOTAGA sont présents par nanoparticules, nous obtenons environ 12,5 Nps pour un nanobody B10Ap. Ce résultat implique que malgré le nombre important de cycle de purification, il est probable qu'une partie des nanoparticules libres soit toujours présentes dans la solution.

3.5.3.3. ESTIMATION DE LA CONCENTRATION EN B10AP PAR SDS-PAGE

Dans un second temps, la concentration en B10Ap est estimée par analyse SDS-PAGE. Ces manipulations ont été réalisées au Centre d'Ingénierie des Protéines de Liège par Mireille Dumoulin (Dr) et Sarah Warnitz (Master 2) [181].

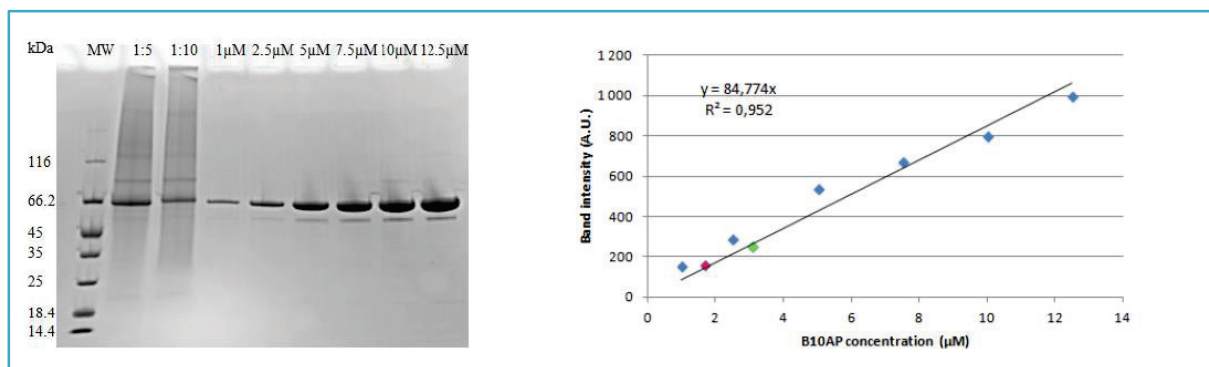


Figure 0-27 : (gauche) Analyse SDS-PAGE 15% : différentes concentrations de B10Ap ainsi que deux concentrations de Nps AGuIX@B10Ap sont déposées sur le gel. (droite) : L'intensité des bandes (déterminées à l'aide du logiciel Gel Doc™ EZ System scanner) sont tracés en fonction de la concentration en B10Ap en μM. L'intensité des bandes issues des deux dilutions des Nps AGuIX@B10Ap sont ici représentées par les diamants rose et vert.

Le SDS-PAGE est une méthode électrophorétique permettant de séparer les protéines déposées sur un gel acrylamide/bisacrylamide en fonction de leur masse molaire³.

Après avoir fait migrer sur le gel le B10Ap à différentes concentrations (de 1 μM à 12,5 μM) (Figure 0-27), l'intensité de chacun des « spots » obtenus est enregistrée à l'aide d'un scanner *Gel Doc™ EZ*

³ Annexe3 : Protocole de quantification du B10Ap par SDS-PAGE

system. Cette intensité est ensuite tracée en fonction de la concentration en nanobody déposé pour obtenir la courbe de calibration ci-dessus.

Des tests préliminaires ont révélé que les nanoparticules étaient dégradées en présence de SDS. Le B10Ap issu des AGuIX@B10Ap peut donc migrer sur le gel de la même façon que le nanobody seul et être quantifié grâce à la courbe de calibration. Cette technique a permis de mesurer que la suspension d'AGuIX@B10AP contenait 1 B10Ap pour 9,6 Nps.

Tableau 0-10 : Comparaison des deux techniques d'estimation du nombre de B10Ap par Np.

Technique de quantif.	B10Ap/Np
Absorbance	1 B10Ap pour 12,5 Np
SDS-PAGE	1 B10Ap pour 9,6 Np

Les deux techniques d'estimation du nombre de nanobody B10Ap par Np convergent. Toutes deux indiquent qu'environ 10 nanoparticules AGuIX pour un nanobody B10Ap sont présentes dans la suspension.

3.5.4. ABILITE DU B10AP ET DES NANOPARTICULES AGuIX@B10AP DE SE LIER AUX FIBRES AMYLOÏDES (DOT BLOT)

La propriété du B10Ap, lié ou non aux nanoparticules, à se fixer aux fibres amyloïdes issues des protéines A β ou α -synucléine a été testée grâce à des expériences de DOT-Blots. Cette technique permet de confirmer la présence ou l'absence de biomolécules. Ces manipulations ont été réalisées au Centre d'Ingénierie des Protéines de Liège par Mireille Dumoulin (Dr) et Sarah Warnitz (Master 2).

Protocole

Tout d'abord, une membrane de nitrocellulose (Parablot NCP) est imprégnée par une solution de TBS (Tris-HCl 50 mM NaCl 150 mM pH 7.5) puis séchée à l'aide d'un papier filtre. Ensuite, la membrane est fonctionnalisée par l'ajout de quantités croissantes de fibres (A β ou α -syn) en solution dans le tampon TBS. Le B10Ap ou les AGuIX@B10Ap sont utilisés comme contrôle positif et le contrôle négatif est réalisé à l'aide de monomères de la protéine α -syn, qui ne se fixent pas au nanobody.

La présence des fibres déposées sur la membrane est vérifiée par coloration avec une solution de rouge Ponceau. La coloration rouge de la membrane est ensuite éliminée par deux rinçages consécutifs à l'aide du tampon TBST (TBS avec 0,1% volumique de Tween® 20) (incubation de 5 min).

Les sites de fixation non spécifiques sont alors saturés avec de l'albumine bovine (BSA) à 3% en solution (incubation de 30 min) et la membrane est à nouveau rincée par le tampon TBST (incubation de 5 min).

Enfin, la membrane est incubée une heure par ajout du B10Ap ou des AGuIX@B10Ap ($[B10Ap]=5 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$). Elle est ensuite rincée par le tampon TBS afin d'éliminer les nanobodies liés de façon non spécifique et le tampon TBST.

La révélation est effectuée par l'observation de l'activité de la phosphatase alcaline. Dans ce but, la membrane est incubée dans un tampon carbonate 100 mM MgCl_2 1 mM contenant $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de bleu de nitro tetrazolium (NBT) et $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de phosphate de 5-bromo-4-chloro-3-indolye (BCIP). Ces deux produits forment en présence de la phosphatase alcaline un produit brun. La présence des nanoparticules marquées à la cyanine 5,5 peut également être observée par fluorescence. Toutes les solutions utilisées pour le test des AGuIX@B10Ap, incluant les solutions de lavages, comprennent toutes des nanoparticules AGuIX nues à la concentration de 3 mM en Gd^{3+} , afin de limiter la dégradation des nanoparticules.

Résultats

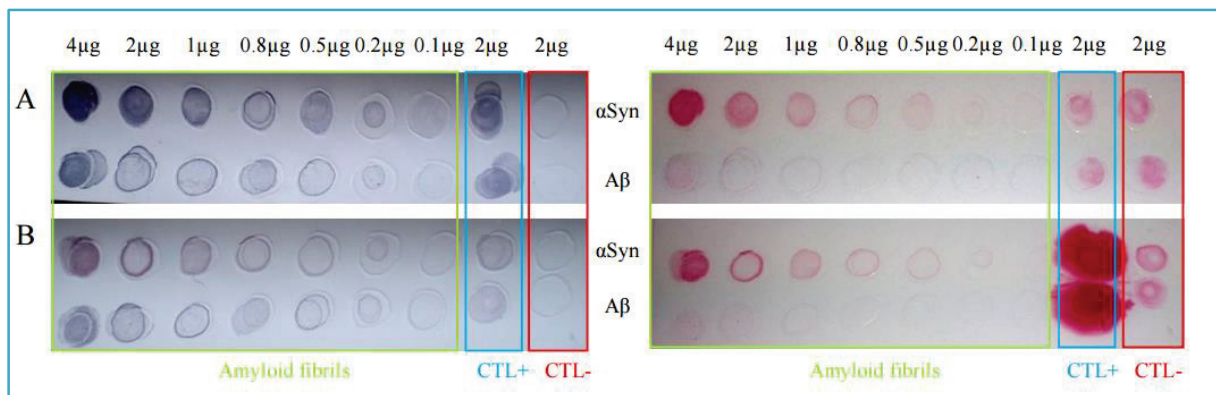


Figure 0-28 : Evaluation de l'affinité du B10Ap (A) et des AGuIX@B10Ap (B) de se lier aux fibres (DOT BLOT). Les quantités de fibres amyloïdes immobilisées sont indiquées en haut de la figure. Le type de fibres immobilisées est indiqué au centre de la figure. Des monomères de protéines α -syn sont utilisés comme contrôle négatif et le B10Ap ou les AGuIX@B10Ap comme contrôle positif. Gauche : la membrane est révélée par observation de l'activité de la phosphatase alcaline. Droite : la membrane est révélée par le rouge Ponceau

Le test au rouge Ponceau, réalisé avant l'incubation avec le B10Ap ou les AGuIX@B10Ap, prouve que des quantités croissantes de fibres ont bien été déposées sur la membrane. Les spots intenses observés sur le contrôle positif des AGuIX@B10Ap sont probablement dus à la présence des nanoparticules libres.

La présence du nanobody (i.e. B10Ap ou AGuIX@B10Ap) est révélée par observation de l'activité de la phosphatase alcaline. Ces analyses montrent que le nanobody est capable de se lier aux fibres A β et α -syn et ne présente pas d'affinité pour le monomère α -syn (contrôle négatif). Cependant, une perte d'activité de la phosphatase alcaline est observée lorsque le B10AP est lié aux nanoparticules. Ceci peut être dû à une interaction avec les Nps qui empêche l'hydrolyse du substrat BCIP/NBT, conduisant ainsi à une diminution de la coloration.

Les nanoparticules AGuIX greffées au nanobody sont marquées à la cyanine 5,5. Il est donc possible de détecter leur présence par imagerie de fluorescence. L'observation d'un signal de fluorescence proportionnel à la quantité déposée permettrait ainsi d'indiquer que les nanoparticules restent bien liées au nanobody lors de ce test.

Pour cette expérience, la membrane utilisée précédemment pour le test de l'activité de la phosphatase alcaline est analysée à l'aide d'un scanner Typhoon Trio + ($\lambda_{exc} = 633 \text{ nm}$; .filtre passe bande à 670 nm ; PMT=500 V ; sensibilité : normale). Les images sont analysées à l'aide du logiciel Image Quant TL v2005.

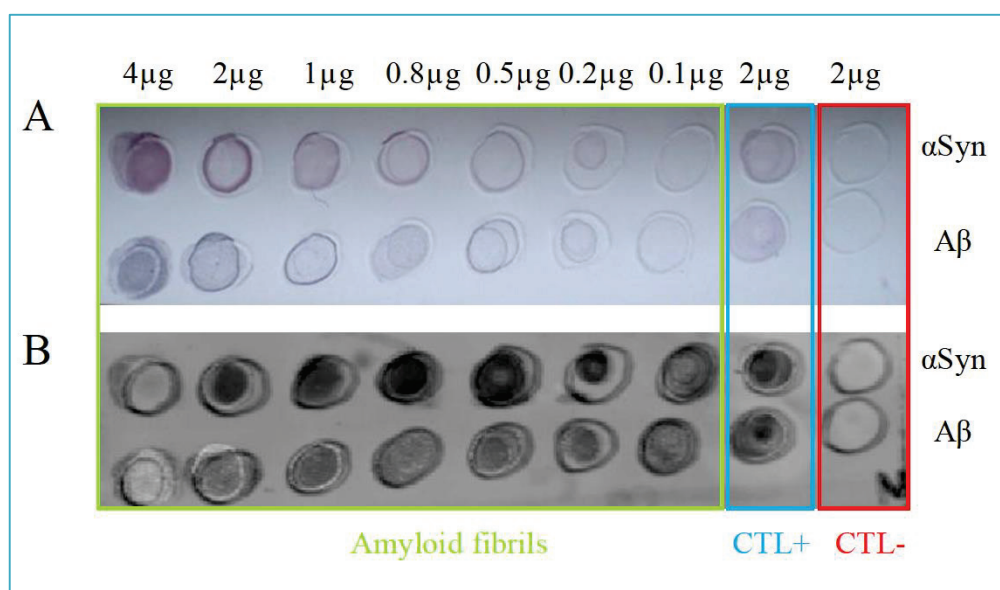


Figure 0-29: Révélation de l'affinité des AGuIX@B10Ap, (A) par détection de l'activité de la phosphatase alcaline ; (B) par détection des nanoparticules marquées à la cyanine 5,5.

L'imagerie de fluorescence est une technique particulièrement sensible. Ainsi, on observe un important signal d'émission de la cyanine5,5 même pour les échantillons les plus dilués. Cependant, pour les échantillons les plus concentrés en B10Ap (4µM), une faible coloration est observée. Ce résultat peut s'expliquer par la présence des révélateurs de l'activité de la phosphatase alcaline : le couple (BCIP/NBT). En effet, ces deux molécules absorbent fortement dans le bleu, au même

longueurs d'ondes que la cy5,5 et pour les échantillons les plus concentrés en B10Ap, de grandes quantités de révélateurs ont été utilisés. Afin de pallier ce problème d'extinction de fluorescence, une même expérience est prévue avec une révélation de la cyanine antérieure à l'ajout des molécules BCIP/NBT. Les résultats obtenus pour les plus faibles concentrations confirment toutefois que les nanoparticules sont toujours présentes au niveau des fibres.

3.5.5. MESURE DE L’AFFINITE PAR RESONANCE PLASMONIQUE DE SURFACE

Le nanobody seul ainsi que les nanoparticules-nanobody ont été analysés sur une puce Biacore® dont les canaux 2 et 4 ont été fonctionnalisés par 2000 R.U. de fibres α -synucléine et 1200 R.U. de fibres A β respectivement. Les canaux 1 et 3 ont quant à eux été dérivés par l’éthanolamine après activation par le couple EDC/NHS, afin de servir de référence pour les canaux 2 et 4 respectivement. Les échantillons circulent successivement sur chacun des quatre canaux à une température fixée à 25°C.

Les deux espèces à tester sont diluées aux concentrations de 4, 8, 16, 32, 64 et 128 nM en B10Ap dans un tampon HBS-P (GE-Healthcare®). Après 5 cycles d’échauffement réalisés avec le tampon HBS-P, chaque échantillon est injecté 3 fois dans l’appareil. Pour chaque cycle d’injection, le flux est fixé à 20 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ pendant 2,5 minutes. La régénération est effectuée par injection d’une solution composée de NaOH à 5 mM et de NaCl à 2 M pendant 60 secondes à 20 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$.

Le nombre d’unité de résonance obtenue à la fin de chaque injection est soustrait au nombre de R.U. obtenus sur le canal de référence correspondant et tracé en fonction de la concentration en B10Ap injecté (Figure 0-30). Les points obtenus sont enfin modélisés avec le modèle de Michaelis –Menten décrit précédemment.

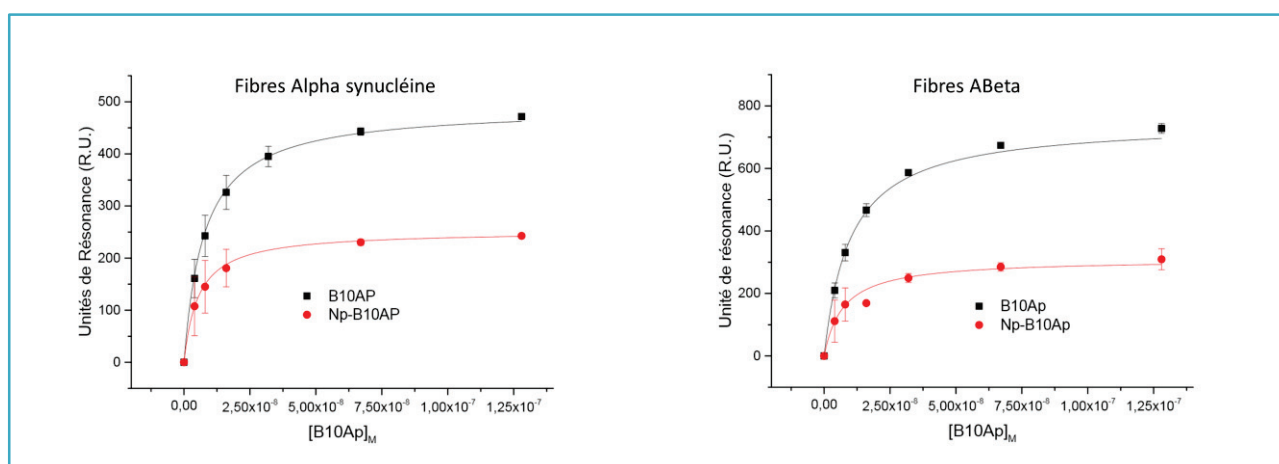


Figure 0-30: Modélisation par le modèle de Michaelis-Menten de la réponse (en unité de résonance) des nanobodies B10 seuls, et conjugués aux nanoparticules, sur les puces alphasynucléine et Abeta.

Les valeurs des modélisations obtenues (K_D et R_{\max}) sont reportées dans le tableau suivant :

Tableau 0-11: Résultats des modélisations d'ordre 1:1 du B10Ap et des Np-B10Ap sur les fibres alpha synucléine et ABeta.

	Alpha synucléine		Abeta	
	R _{max} (R.U.)	K _D (M)	R _{max} (R.U.)	K _D (M)
B10Ap	500	$7,7 \cdot 10^{-9}$	760	$9,9 \cdot 10^{-9}$
Np-B10Ap	244	$8,9 \cdot 10^{-9}$	345	$14,5 \cdot 10^{-9}$

Tout d'abord, ces résultats montrent que les étapes de synthèse, purification et lyophilisation ne dégradent pas le nanobody et que celui-ci conserve son affinité vis-à-vis des deux types de fibres amyloïdes. L'affinité du B10Ap observé pour les fibres ABeta est de l'ordre de $9,9 \cdot 10^{-9}$ M, très proche de la valeur de $(7,22 \pm 0,97) \cdot 10^{-9}$ M obtenue par Habicht *et al.*[9]. L'affinité du Nb vis-à-vis des fibres alpha synucléine, non décrite dans la littérature, est du même ordre de grandeur, soit $7,7 \cdot 10^{-9}$ M. Ces résultats prouvent que le B10Ap présente une affinité conformationnelle pour plusieurs types de fibres amyloïdes.

Une fois couplé aux nanoparticules, il apparaît que le taux d'immobilisation maximum, R_{max} (R.U.), diminue significativement pour être divisé par deux par rapport aux valeurs obtenues pour le B10Ap seul. Cette différence peut s'expliquer par la modification des indices de réfraction du milieu du à l'introduction des nanoparticules hybrides organiques-inorganiques. Toutefois, après la modélisation des données par le modèle de Michealis-Menten d'ordre 1, il ressort que les constantes de dissociation restent dans le même ordre de grandeur pour chacun des types de fibres. En effet, la constante de dissociation du Np-Nb pour les fibres ABeta est de l'ordre de $14,5 \cdot 10^{-9}$ M contre $9,9 \cdot 10^{-9}$ M pour le B10Ap seul ; et de $8,9 \cdot 10^{-9}$ M pour les fibres alpha synucléine contre $7,7 \cdot 10^{-9}$ pour le B10Ap seul.

Les résultats obtenus en SPR et en DOT-Blot sont très encourageants. La prochaine étape de cette étude doit ainsi consister au test de l'affinité des AGuIX@B10Ap *ex vivo* sur des coupes de cerveau de souris atteintes de la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson.

3.6. COMPARAISON DES STRATEGIES _ PERSPECTIVES

Les nanoparticules AGuIX ont été fonctionnalisées par trois ligands différents dans le but de cibler spécifiquement les fibres amyloïdes : les pentapeptides beta breaker LPFFD et KLVFF ; le Pittsburgh compound B et le nanobody B10Ap. Dans chacun des cas, les stratégies de synthèses ont dû être optimisées afin de s'adapter aux particularités du composé à greffer. Ces trois types de ligands devant tous être liés aux nanoparticules via couplage peptidique avec leur amine primaire, il était nécessaire de modifier en amont la surface des Nps afin d'y introduire de nouvelles fonctions acide carboxylique qui permettent d'augmenter le nombre de sites de greffage. Ainsi les nanoparticules de départ ont préalablement été fonctionnalisées par de petites chaînes de polyéthylène glycol.

La fonctionnalisation des Nps par les peptides permet de greffer environ 2 vecteurs présents par Np. De plus, les tests réalisés en SPR indiquent que ce greffage covalent n'induit pas de perte significative de l'affinité des peptides. Les différents tests d'association réalisés *in vitro* en SPR et en fluorescence ainsi qu'*ex vivo* sur les coupes de cerveaux de souris modèles sont en accord. Ils montrent que les AGuIX@PEG@Peptides interagissent spécifiquement avec les dépôts amyloïdes issus de la protéine A beta. Néanmoins, leurs constantes de dissociation (obtenues par SPR) sont de l'ordre de plusieurs centaines de μM et par conséquent caractéristiques d'une interaction faible. Dans le cadre de tests *in vivo*, il est incertain que ces nanoparticules puissent s'accumuler au niveau des fibres en quantité suffisante pour obtenir un signal d'imagerie significatif (IRM, Fluorescence, ...).

Actuellement, l'équipe AFFOND du CEA de Grenoble réalise le « screening » de nouveaux fragments peptidique issus de la protéine Abeta dans le but de sélectionner celui présentant la constante de dissociation la plus faible possible. La même stratégie est également mise en place afin de sélectionner des fragments issus des protéines amyloïdogéniques TTR et IAPP. Le couplage des peptides aux Nps n'induisant pas de perte significative de leur affinité, il serait ainsi possible à terme de proposer un catalogue d'AGuIX fonctionnalisées par différents peptides dans le but de cibler et d'imager un type d'amyloïdose spécifique.

Une autre stratégie mise en place pour cibler spécifiquement les fibres amyloïdes consiste à greffer les Nps sur le nanobody B10Ap. Ce site de reconnaissance naturel présente une extraordinaire affinité ($K_D \simeq 10.10^{-9} \text{ M}$) pour les conformations en protofilaments ou en fibres matures issues des protéines Abeta, mais également issues des protéines d'alpha synucléine, d'insuline, de glucagon, et des chaînes légères de l'immunoglobine (AL) [9]. Des nanoparticules AGuIX présentant environ 7 % de DOTA libres furent utilisées pour greffer ce nanobody. Les tests réalisés en SPR prouvent que les différentes étapes de synthèse et de purification ne perturbent pas la reconnaissance des fibres

ABeta ou Alphasynucléine par le B10Ap. Les tests réalisés par DOT BLOT confirment la conservation de l'affinité du B10Ap pour les fibres une fois greffé aux Nps.

Le nanobody, de par son affinité de l'ordre du nM est susceptible de s'accumuler *in vivo* au niveau des fibres amyloïdes à de très faibles concentrations. Particulièrement stable, il conserve son activité après les étapes de synthèse et de purification nécessaires à son greffage aux Nps. Toutefois, sa production est particulièrement longue et onéreuse en comparaison à celles de petits peptides (ex : peptides beta breaker) ou de molécules organiques comme le PIB. L'affinité de cet agent d'imagerie potentiel pour la maladie d'Alzheimer et de Parkinson doit prochainement être évaluée *ex vivo*.

La dernière stratégie mise en place faisait appel au Pittsburgh Compound B, une molécule qui, radiomarkée au ^{11}C , a montré la propriété de s'accumuler *in vivo* chez des patients humains au niveau des zones atteintes par l'AD [8]. Cette molécule fut greffée aux acides carboxyliques des AGuIX@PEG₂₅₀@COOH via couplage peptidique. Seulement, de par la très faible réactivité de cette amine en α du cycle benzénique, de faible rendement furent obtenus avec environ une particule sur cinq fonctionnalisée par le PIB.

Les tests d'association, réalisés en fluorescence et en SPR, prouvent que le greffage du PIB sur les Nps n'induit pas de perte significative de son affinité. Les constantes de dissociation déterminées en fluorescence par l'équipe AFFOND du CEA de Grenoble sont de l'ordre de 15-50 μM selon le type de fibres (Abeta, TTR ou IAPP). En comparaison aux Nps vectorisées par les peptides LPFFD et KLVFF, les nanoparticules sont ainsi plus susceptibles de s'accumuler spécifiquement *in vivo* chez des rongeurs modèle. De plus, les propriétés de luminescence du PIB permettent son observation en histologie sans avoir recours à l'ajout d'un marqueur fluorescent supplémentaire.

Les nanoparticules AGuIX@PIB doivent prochainement être injectées *in vivo* chez un modèle de souris Alzheimer. Toutefois, la principale limitation dans l'étude de vecteurs ciblant la maladie d'Alzheimer est le passage de la Barrière Hémato Encéphalique (BHE). En effet, cette membrane extrêmement sélective isole le système nerveux central du reste de la circulation sanguine dans le but d'empêcher le passage de différents agents pathogènes, de toxines ou de corps étrangers (ex : anticorps, nanoparticules, ...). Plusieurs méthodes ont été développées afin de perméabiliser cette barrière [182], notamment :

- (i) L'injection d'agents osmotiques comme le mannitol [183]
- (ii) L'injection intra-artérielle de composés via la carotide [183]

Ces techniques permettent d'ouvrir la BHE de manière non localisée, rendant le système nerveux central particulièrement vulnérable vis-à-vis d'agents extérieurs. Dans ce cadre, une nouvelle méthode permettant de perméabiliser la BHE localement grâce à l'effet combiné d'ultrasons et de microbulles (Figure 0-31) a été développée [182], [184].

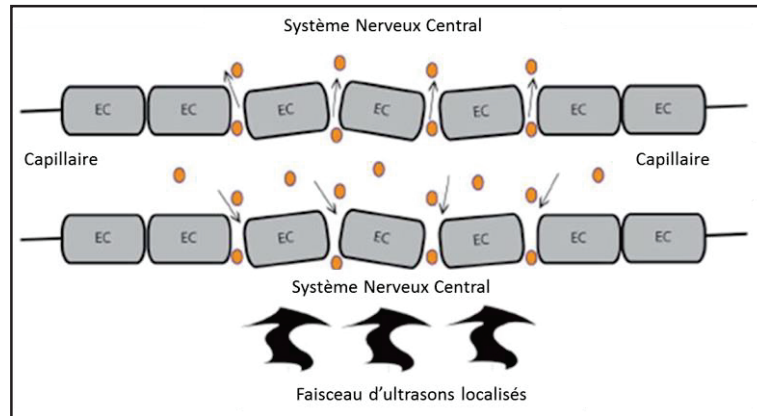


Figure 0-31 : Représentation schématique de l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique par l'application d'un faisceau d'ultrasons localisé. Adapté de Etame et al.

L'équipe de Sébastien Mériaux et Benoit Larrat du Laboratoire Neurospin du CEA de Saclay s'est intéressée à cette technique. Ils ont notamment découvert une relation entre le diamètre hydrodynamique de différents agents de contraste IRM (de 1 à 65 nm) et les temps d'ouverture et de fermeture la BHE [185]. Leurs résultats sont particulièrement prometteurs dans le cadre de la délivrance dans le cerveau de nanoparticules.

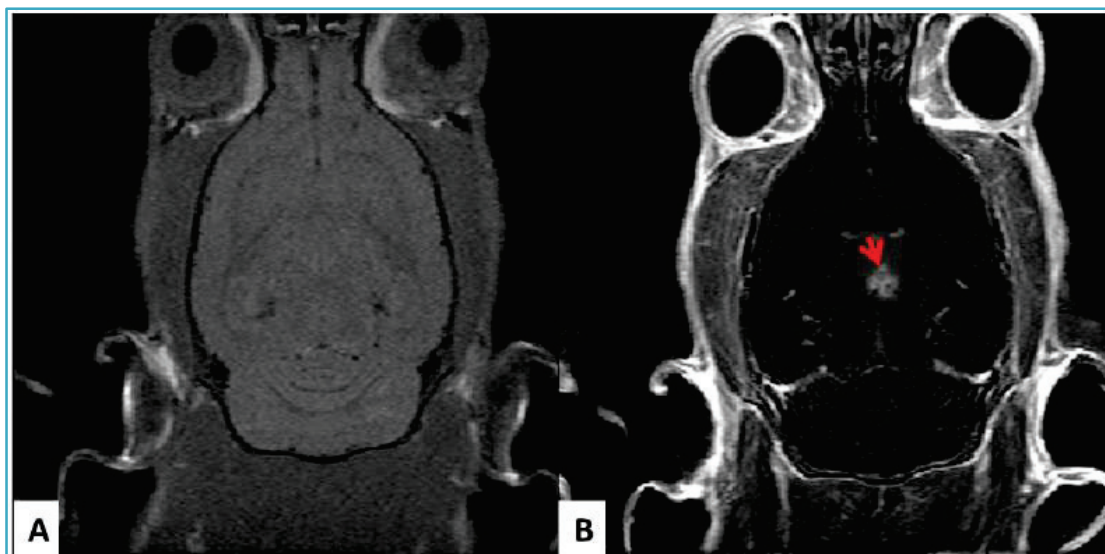


Figure 0-32 : A. Image T1 obtenue avant l'injection des Nps AGuIX et ouverture de la BHE. B. Image T1 acquise après ouverture de la BHE et injection des Nps AGuIX.

Leurs expériences préliminaires réalisées sur les Nps AGuIX et AGuIX@PEG sont très encourageantes. Comme vu dans la Figure 0-32, leur protocole permet aux Nps de traverser la BHE, où la flèche rouge désigne le rehaussement de contraste dû au passage des AGuIX dans les tissus cérébraux au point focal des ultrasons.

Un sujet de thèse débutant en octobre 2015, intitulé « Imagerie moléculaire de l'amyloïdose dans des modèles rongeurs de la maladie d'Alzheimer combinant l'ouverture de la barrière hématoencéphalique » a ainsi été proposé par l'équipe de Sébastien Mériaux en partenariat avec notre équipe. Le but de ce projet consistera à tester les différentes nanoparticules vectorisées développées au cours de ma thèse sur des modèles rongeurs Alzheimer après ouverture de la BHE par ultrasons. Ces études permettront d'évaluer *in vivo* le pouvoir ciblant des Nps, de mieux comprendre le développement de la maladie d'Alzheimer à des stades précoces et de suivre l'efficacité potentielle de nouvelles approches thérapeutiques.

CHAPITRE 4: CIBLAGE DE CELLULES HEPATOCYTES

4. CHAPITRE 4: CIBLAGE DE CELLULES HEPATOCYTES

Les nanoparticules AGuIX ont également été fonctionnalisées par un composé dérivé du lactose dans le but de cibler spécifiquement les cellules hépatocytes du foie. Ce projet a été réalisé en collaboration avec l'Unité de Technologies Chimiques et Biologiques pour la Santé (UTCBS) de l'Université Paris-Descartes. En particulier, l'équipe de Nathalie Mignet est responsable de la production des composés lactosylés et des tests de fluorescence *in vitro* et *in vivo*, et l'équipe de Bich-Tuy Doan et de Grégory Raminceanu est responsable des tests d'Imagerie par Résonance Magnétique sur le petit animal.

4.1. CIBLAGE DE CELLULES HEPATOCYTES PAR LE LACTOSE

Le foie assure de nombreuses fonctions vitales de l'organisme. Il intervient par exemple dans le métabolisme des sucres et des graisses. Il permet notamment de stocker et de transformer le glucose en glycogène et est le seul organe capable d'éliminer le cholestérol [186]. Les fonctions hépatiques du foie sont assurées par les cellules hépatocytes. L'évaluation de ces fonctions peut être utilisée dans le diagnostic de nombreuses maladies telles que la cirrhose, les hépatites, la fibrose ou le cancer. Aujourd'hui ces diagnostics sont principalement réalisés de manière invasive par biopsie.

Or, les cellules hépatiques ont à leur surface un grand nombre de récepteurs d'asialoglycoprotéine (ASGP-R) [187] qui interagissent avec différents carbohydrates tel que le lactose [188], [189]. La constante de dissociation entre le lactose et l'ASGP-R, obtenue par Onizuka *et al.* par SPR, est de $318 \pm 13 \mu\text{M}$ [190]. Les cellules de Kupffer ou les cellules endoléliales, également présentes dans le foie, ne possèdent pas ou peu d'ASGP-R. Ainsi, ce récepteur constitue un biomarqueur d'intérêt pour le ciblage actif et spécifique des cellules hépatiques pour des applications en imagerie médicale ou en délivrance de médicaments.

Coupler un lactose à un agent d'imagerie permet de réaliser un diagnostic des fonctions hépatiques sans recourir à des techniques invasives comme la biopsie. Ainsi, en 2010, Chaumet-Riffaud *et al.* ont démontré que des protéines d'albumine fonctionnalisées par un dérivé lactose et marquées au technetium-99m permettaient de mesurer la fonction hépatique par scintigraphie *in vivo* chez le petit animal [191]. Ketkar-Atre *et al.* ont quant à eux fonctionnalisé par le lactose des nanoparticules de magnétoliposomes pour l'imagerie IRM des cellules hépatocytes [192]. Le lactose a également été greffé à des nanoparticules de chitosane [193], de silice mésoporeuse [194], ou d'albumine [195] pour la délivrance localisée de médicaments dans le foie.

La vectorisation des nanoparticules AGuIX par un dérivé lactose permettrait de les accumuler spécifiquement au niveau des cellules hépatocytes afin de réaliser un diagnostic par imagerie multimodale de la fonction hépatique.

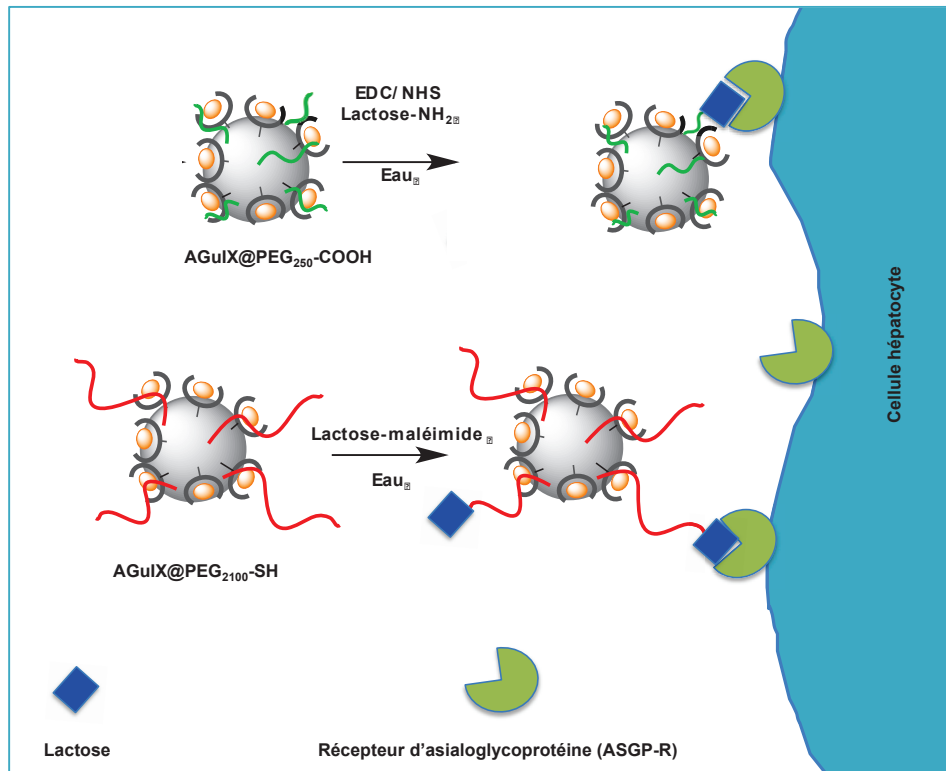


Figure 4-1 : Stratégie de ciblage des cellules hépatiques du foie à partir des AGuIX@PEG₂₅₀-COOH (vert) ou des AGuIX@PEG₂₁₀₀-SH (rouge).

Dans cet objectif, nous avons vectorisé les nanoparticules AGuIX fonctionnalisées par des chaînes de PEG de deux longueurs différentes : 250 Da ou 2100 Da.

4.2. DEUX VOIES DE GREFFAGE DU LACTOSE

Deux voies de synthèse ont été réalisées afin de vectoriser les nanoparticules AGuIX par le lactose. La première consiste à greffer un dérivé lactose –o- éthylamine sur les Nps AGuIX@PEG₂₅₀-COOH. La seconde consiste à greffer un dérivé lactose-maléimide sur les Nps AGuIX@PEG₂₁₀₀-SH.

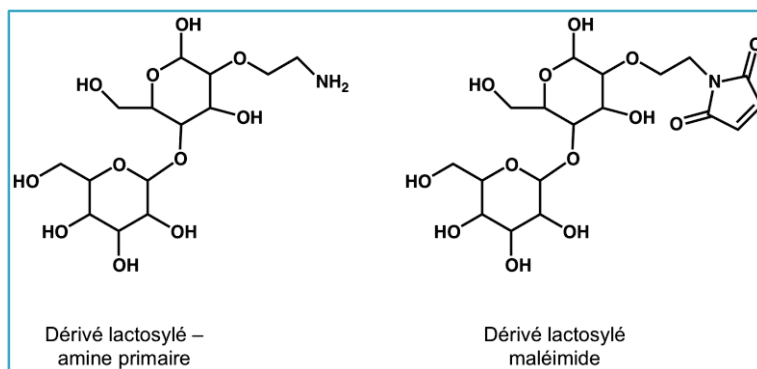


Figure 4-2 : Molécules de lactose présentant un site de greffage amine primaire (gauche) ou maléimide (droite).

4.2.1. GREFFAGE DU LACTOSE-O-ETHYLAMINE SUR LES AGuIX@PEG₂₅₀-COOH

Le composé lactose est greffé aux nanoparticules AGuIX@PEG₂₅₀@COOH par couplage peptidique entre les acides carboxyliques des Nps et l'amine primaire du lactose-o-éthylamine.

4.2.1.1. PROTOCOLE

Les nanoparticules AGuIX@PEG₂₅₀-COOH lyophilisées sont redispersées dans l'eau ultrapure à 100 mM en Gd³⁺, (pH=5,5). Après 30 minutes de stabilisation, les fonctions acides carboxyliques des Nps sont activées par 5 équivalents de EDC et 10 équivalents de NHS par équivalent de Gd³⁺ sous agitation magnétique pendant 30 minutes. Ensuite, le pH de la solution est réglé à 7,2-7,5 par ajout d'une solution de soude à 0,1 M. Puis, 2 équivalents de lactose en solution dans l'eau à 100 mg.mL⁻¹ par équivalent de Gd³⁺ sont ajoutés à la suspension de Nps activées. Le mélange est placé sous agitation magnétique à température ambiante pendant 4 heures. Enfin, les nanoparticules sont purifiées par filtration tangentielle sur une membrane d'un seuil de coupure de 5 kDa jusqu'à l'obtention d'un taux de purification supérieur à 10 000. Cette étape permet d'éliminer les nanoparticules dégradées, les molécules d'EDC et de NHS ainsi que les molécules de lactose n'ayant pas réagi.

4.2.1.2. CARACTERISATIONS QUALITATIVES

Le greffage du composé lactose sur les Nps AGuIX@PEG₂₅₀-COOH a pour conséquence une augmentation de leur diamètre hydrodynamique passant de $4,3 \pm 1,0$ nm à $5,0 \pm 2,0$ nm (Figure 4-3).

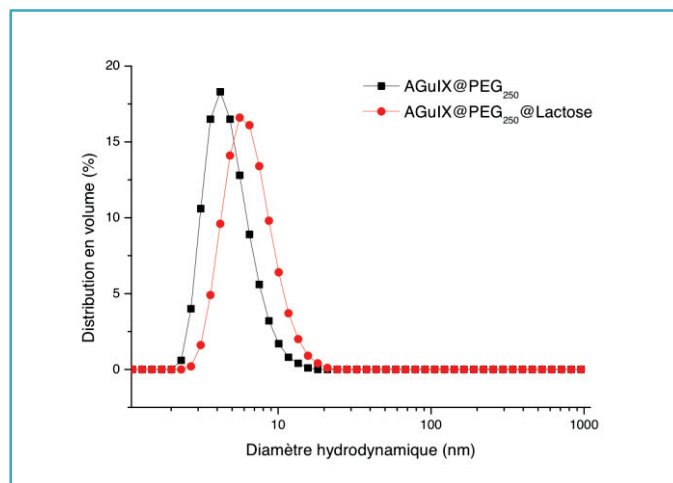


Figure 4-3 : Diamètre hydrodynamique des AGuIX@PEG₂₅₀ et des AGuIX@PEG₂₅₀@Lactose, mesures réalisées à l'aide d'un granulomètre NanoZS ($\lambda=633$ nm) à 10 mM en Gd³⁺ dans l'eau.

En HPLC, par détection UV visible à 295 nm (soit le maximum d'absorption des nanoparticules), un décalage de temps de rétention t_r est également observé (Figure 4-4). En effet, de 12,4 minutes pour les nanoparticules de départ, celui-ci atteint la valeur de 13,2 minutes pour les nanoparticules fonctionnalisées par le composé lactose. On observe également une augmentation de la largeur à mi-hauteur du pic correspondant aux AGuIX@PEG₂₅₀@Lactose, en accord avec la plus large distribution obtenue en DLS.

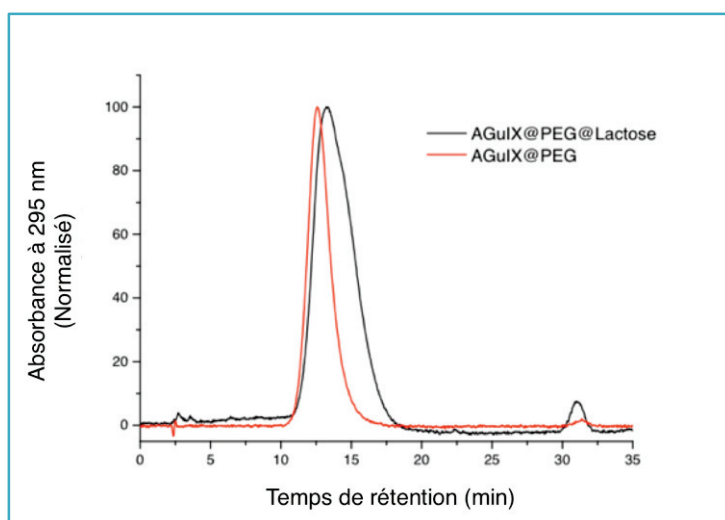


Figure 4-4 : Chromatogrammes des AGuIX@PEG₂₅₀ et des AGuIX@PEG₂₅₀@Lactose avec détection UV-Visible à 295 nm

Enfin, les nanoparticules AGuIX@PEG₂₅₀@Lactose présentent une relaxivité de 12,8 s⁻¹.mM⁻¹ à 60 MHz à 37 °C contre 12,0 s⁻¹.mM⁻¹ pour les nanoparticules de départ dans les mêmes conditions. Or, la valeur de la relaxivité est directement dépendante de la taille et de la rigidité de l'objet paramagnétique. Ainsi, ces différentes caractérisations sont en accord avec une fonctionnalisation des nanoparticules par le dérivé lactosylé.

4.2.2. GREFFAGE DU LACTOSE-MALEIMIDE SUR LES AGuIX@PEG₂₁₀₀-SH

Le composé Lactose-Maléimide est greffé aux nanoparticules AGuIX@PEG₂₁₀₀-SH par couplage covalent entre le doublet non liant de la fonction maléimide et le groupement sulfhydryle des Nps. Cette réaction ne nécessite pas l'ajout de molécules d'activateurs (voir §2.3.2.3.2).

4.2.2.1. PROTOCOLE

Les nanoparticules AGuIX@PEG₂₁₀₀-SH lyophilisées sont redispersées à 100 mM en Gd³⁺ dans l'eau ultrapure. Après 30 minutes de stabilisation, 2 équivalents de lactose-maléimide à 100 mg.mL⁻¹ par équivalent de Gd³⁺ sont ajoutés à la suspension de Nps. Le mélange est placé sous agitation magnétique à température ambiante pendant 4 heures. Enfin, la suspension est purifiée par filtration tangentielle sur une membrane d'un seuil de coupure de 10 kDa jusqu'à l'obtention d'un seuil de purification d'au moins 10 000.

4.2.2.2. CARACTERISATIONS QUALITATIVES

Comme observé précédemment, le greffage du composé lactose induit une croissance relative du diamètre hydrodynamique des nanoparticules qui augmente de 5,9 ± 2,0 nm à 6,2 ± 2,5 nm.

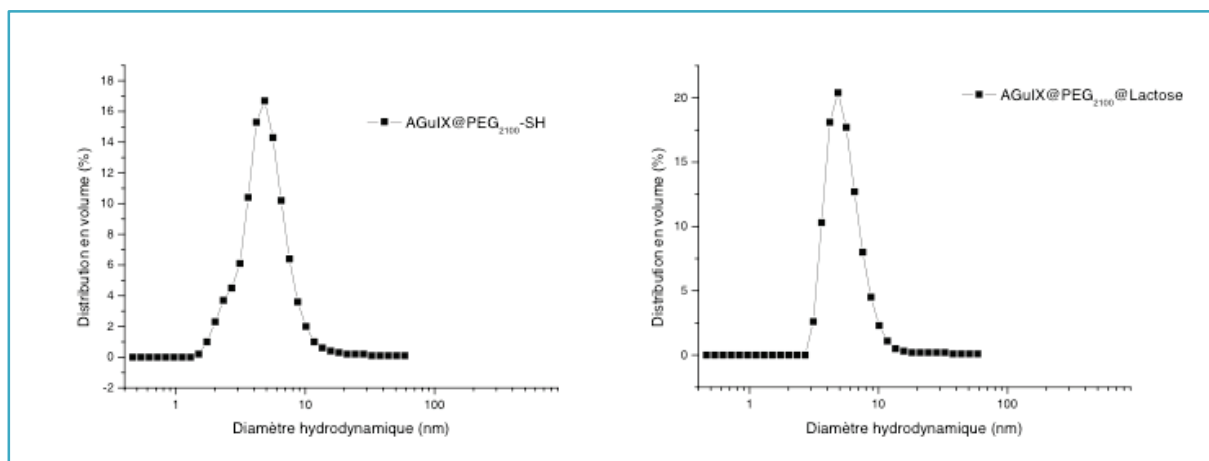


Figure 4-5 : Diamètre hydrodynamique des AGuIX@PEG₂₁₀₀-SH et des AGuIX@PEG₂₁₀₀@Lactose, obtenus à l'aide d'un granulomètre NanoZS ($\lambda=633$ nm) à 10 mM en Gd³⁺ dans l'eau (en présence de TCEP).

De même, les chromatogrammes réalisés par détection UV-Visible 295 nm révèle que le pic de rétention principal est décalé de 15,5 minutes à 17,2 minutes.

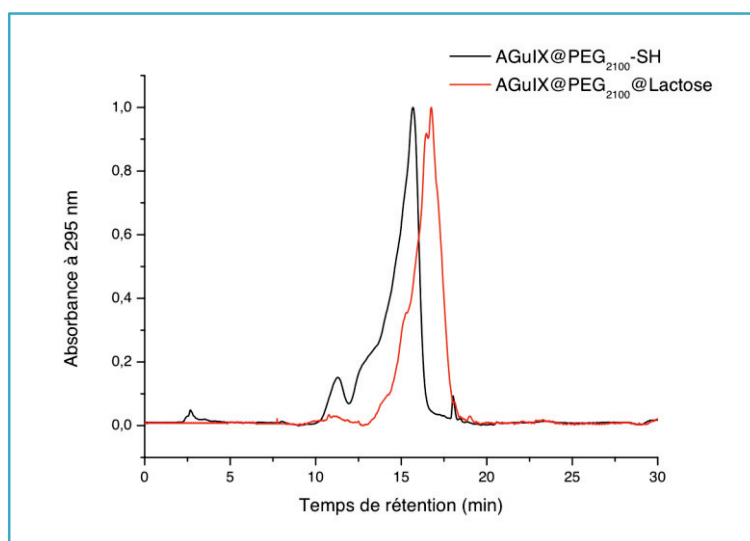


Figure 4-6 : Chromatogrammes des AGuIX@PEG₂₁₀₀ et AGuIX@PEG₂₁₀₀@Lactose réalisés par détection UV-Visible à 295 nm.

Enfin, le greffage du composé lactose induit une très légère augmentation de la relaxivité longitudinale des Nps de $14,2 \text{ s}^{-1}.\text{mM}^{-1}$ à $14,6 \text{ s}^{-1}.\text{mM}^{-1}$ à 60 MHz à 37°C. Les différentes caractérisations qualitatives sont en accord et montrent qu'au moins une partie des nanoparticules auraient bien été fonctionnalisées par le lactose. Quantification du lactose par la méthode Dubois

Le nombre de molécules de lactose greffées à la surface des Nps est quantifié par la méthode « acide sulfurique – phénol » ou méthode de Dubois [196], [197]. Développée dans les années 1950, cette technique, bon marché et facile à mettre en place, permet de quantifier les sucres par absorption UV-Visible.

En présence d'acide fort et de chaleur, les carbohydrates subissent une série de réactions de déshydratation conduisant à la formation de dérivés furanes [198]. Ces dérivés se condensent alors entre eux ou avec des molécules de phénol présentes pour former un composé dont l'absorption à 490 nm est proportionnelle à la concentration en sucres.

Protocole

Les solutions étalons de lactose (respectivement le lactose-o-éthylamine et le lactose maléimide) sont préparées à partir d'une solution de départ à 1 mg.mL^{-1} dans l'eau ultrapure. 500 μL de solutions aux concentrations de 0 ; 25 ; 50 ; 100 et 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ sont préparées en diluant la solution de départ dans une solution de phénol à 5% volumique dans l'eau ultrapure. 2,5 mL d'acide

sulfurique pur sont alors versés rapidement dans chacun des tubes, puis les solutions (tubes fermés) sont homogénéisées par vortex. Cette étape provoque un fort dégagement de chaleur. Les échantillons à quantifier sont préparés selon le même protocole.

Les différents échantillons sont ensuite incubés pendant 1 heure à température ambiante. Ensuite, les échantillons sont analysés en UV-Visible de 350 à 650 nm. L'absorbance à 490 nm, soustraite par l'absorbance à 600 nm est enfin tracée en fonction de la concentration massique en lactose (Figure 4-7).

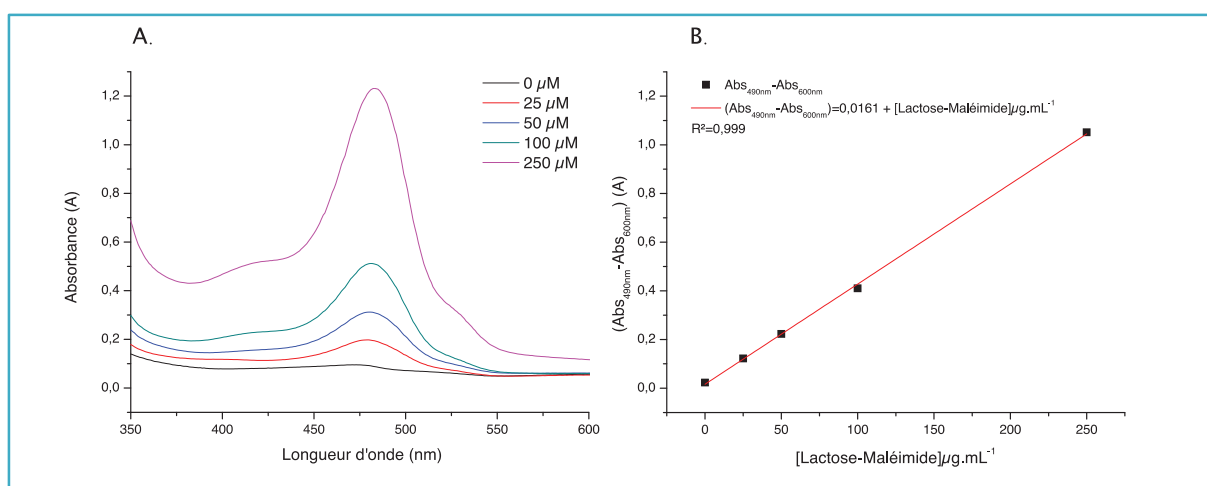


Figure 4-7 : A. Spectres d'absorption UV-Visible du lactose-maléimide à différentes concentrations après réaction avec le phénol et l'acide sulfurique. B. droite étalon de l'absorbance du composé obtenu en fonction de la concentration en lactose-maléimide de départ.

Résultats

Les nanoparticules AGuIX@PEG₂₅₀ et AGuIX@PEG₂₁₀₀ ont toutes deux été fonctionnalisées par le composé lactose. Selon la Np de départ, le lactose a été greffé soit par couplage peptidique, soit par réaction entre un thiol et un maléimide.

D'après le dosage de Dubois, et en faisant l'hypothèse que les AGuIX présentent toujours 10 ligands DOTAGa(Gd^{3+})/Np :

(i) les AGuIX@PEG₂₅₀ ont été fonctionnalisées par 0,91 lactose par nanoparticule (0,091 lact/ Gd^{3+})

(ii) les AGuIX@PEG₂₁₀₀ ont été fonctionnalisées par 2,17 lactose par nanoparticule (0,217 lact/ Gd^{3+}).

Le comportement *in vivo* de ces nanoparticules est ensuite étudié par IRM afin de déterminer (i) l'influence du greffage de chaîne de PEG à haut poids moléculaire ; (ii) l'influence du dérivé lactose greffé à la surface des nanoparticules.

4.3. ETUDE DE LA BIODISTRIBUTION DES NANOPARTICULES PAR IRM

Les études de biodistribution par Imagerie à Résonance Magnétique ont été menées par Grégory Raminceanu et Bich-Tuy Doan de l'Unité de technologie chimique et biologique pour la santé (UTCBS) de Chimie ParisTech. Chacune des nanoparticules a été testée sur deux séries de trois souris nude.

4.3.1. BILAN CINETIQUE DES CAPTURES RENALES ET HEPATIQUES

Le comportement *in vivo* des différentes nanoparticules est étudié par suivi du contraste en IRM après injection de 100 μL à 20 mM en Gd^{3+} dans la veine caudale des souris. Le suivi du contraste induit par les nanoparticules AGuIX est réalisé sur un Micro IRM haut champ (7 Tesla) à l'aide des séquences suivantes (Tableau 4-1). Cette méthode est le résultat d'une optimisation entre la résolution spatiale et temporelle. Elle permet ainsi de réaliser un grand nombre d'acquisition au court du temps (toutes les 3 minutes) et donne accès aux cinétiques de capture et d'élimination des nanoparticules dans les zones d'intérêts.

Type de séquence	Séquence		Durée
Anatomique pondération T_1	Séquence IntraGate FLASH,	1 point temporel	3 min
Dynamique d'acquisition pondération T_1	Synchronisation respiratoire Tranches de 1 mm Rein gauche, rein droit et foie	13 points obtenus toutes les 3 minutes pendant 40 minutes	40 min
		1 point temporel à 240 minutes et à 24 heures	3 min

Tableau 4-1 : Protocole de suivi des Nps AGuIX par IRM

Le suivi du contraste est réalisé au niveau du foie et des deux cortex rénaux afin d'obtenir la cinétique de capture hépatique et rénale de chacun des types de nanoparticules. La figure suivante montre l'exemple des contrastes obtenus pour les différentes nanoparticules testées au niveau d'une coupe centrée sur le foie. On observe bien une augmentation significative du contraste post injection, suivi d'un retour progressif au contraste de départ, au fur et à mesure de l'élimination des nanoparticules par voie rénale.

Les différents rehaussement de contraste obtenus au cours du temps sont tracés en fonctions du log du temps (en minutes) pour obtenir le bilan cinétique de capture hépatique et rénale (Figure 4-9.A) et (Figure 4-9.B)

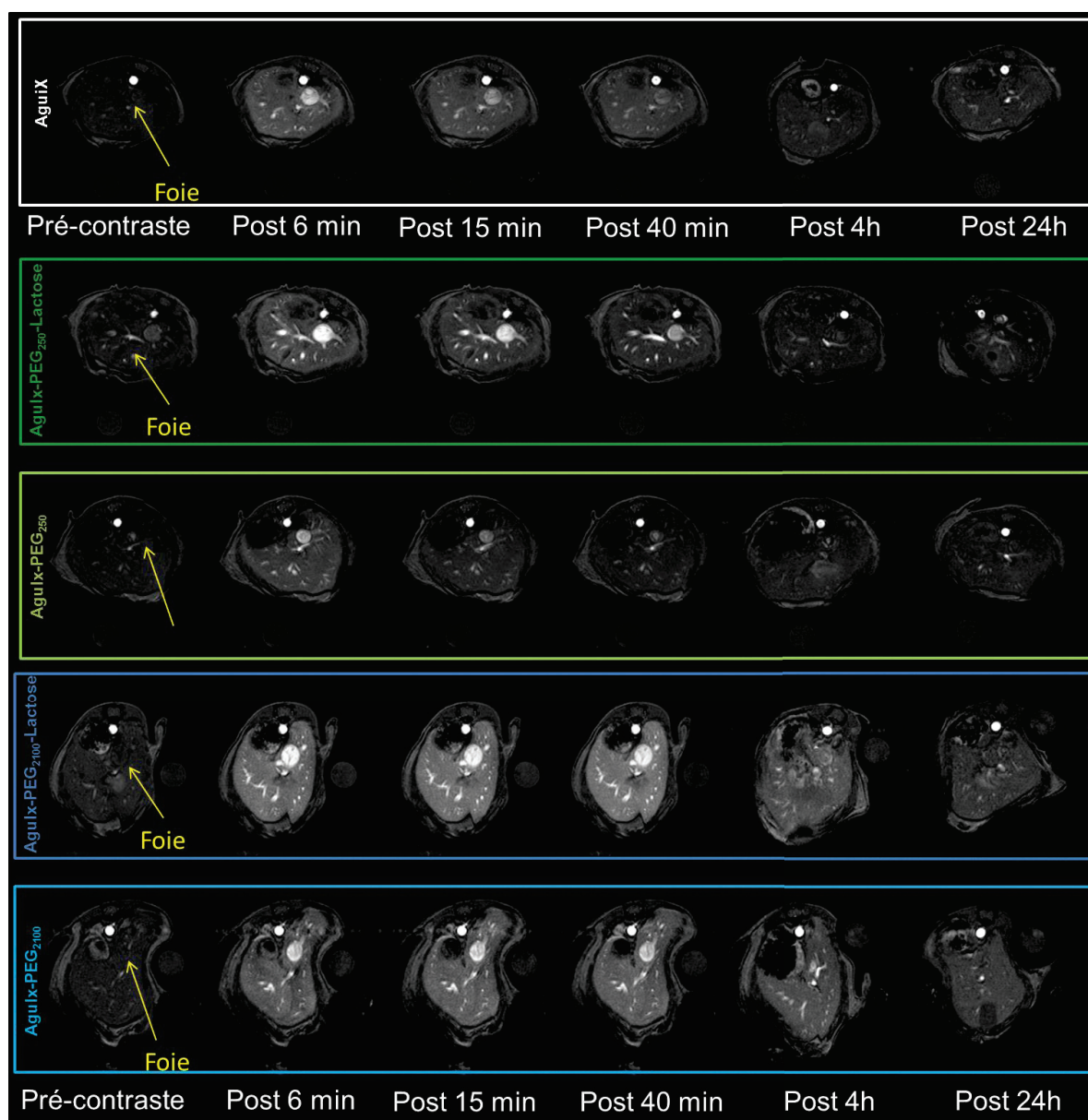


Figure 4-8 : Images IRM (7T) de coupes centrées sur le foie obtenues au cours du temps après injection des nanoparticules AGuIX, AGuIX@PEG₂₅₀-COOH, AGuIX@PEG₂₅₀@Lactose, AGuIX@PEG₂₁₀₀-SH et AGuIX@PEG₂₁₀₀@Lactose.

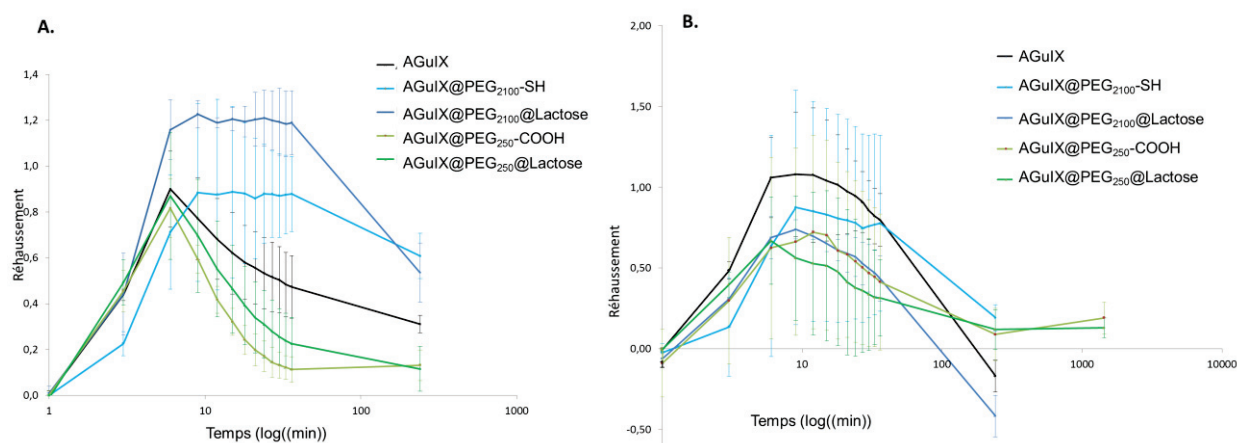


Figure 4-9 : Bilan cinétique de capture hépatique (A) et rénale (B), en fonction du temps (log(min)).

Le pic d'intensité de rehaussement hépatique est très proche pour les nanoparticules AGuIX, AGuIX@PEG₂₅₀-COOH et AGuIX @PEG₂₅₀@Lactose : 90 % de rehaussement sont obtenus 6 minutes *post* injection. Le contraste décroît ensuite rapidement pour revenir à son niveau initial au bout d'environ 100 minutes.

Pour les AGuIX@PEG₂₁₀₀-SH et les AGuIX@PEG₂₁₀₀@Lactose, le pic d'intensité de rehaussement est de 90% à 9 minutes et 120% à 6 minutes *post* injection respectivement. Contrairement à ce qui est observé pour les Nps précédentes, le contraste atteint un plateau et reste constant jusqu'à 36 minutes *post* injection.

La rémanence rénale suit le même profil quel que soit le type de nanoparticules injectée. Dans le cas des AGuIX et des AGuIX @PEG₂₁₀₀@Lactose, un rehaussement négatif est observé au bout d'environ 100 minutes. Bien que les AGuIX soient des agents de contraste positifs, ce contraste négatif peut s'expliquer soit par une interaction forte entre les Nps et le cortex rénal, qui peut conduire à une modification des propriétés magnétiques des Nps soit par un effet de concentration.

4.3.2. INFLUENCE DU GREFFAGE DES CHAÎNES DE PEG₂₁₀₀-SH

Il apparaît que le greffage de chaînes de PEG à haut poids moléculaire (2100 Da) possédant des terminaisons thiols présente une influence sur la biodistribution des nanoparticules. Cette fonctionnalisation semble apporter une spécificité hépatique aux nanoparticules AGuIX.

La fonctionnalisation des Nps par des chaînes de PEG très courtes (250 Da) ne semble pas avoir d'influence sur leur captation hépatique. En effet, les AGuIX et les AGuIX@PEG₂₅₀-COOH circulent très peu dans le foie. Ces nanoparticules s'accumulent très rapidement au niveau des reins pour être ensuite éliminées de l'organisme.

4.3.3. INFLUENCE DU GREFFAGE DU DERIVE LACTOSE SUR LA BIODISTRIBUTION

HEPATIQUE.

Comme nous venons de le voir, les AGuIX@PEG₂₅₀-COOH circulent très peu au niveau du foie. C'est également le cas de ces Nps fonctionnalisées par le dérivé lactosylé, les AGuIX@PEG₂₅₀@Lactose. Le profil de captation hépatique de ces deux types de Nps est très proche. Bien qu'un signal légèrement plus important soit observé au niveau du foie entre 10 et 36 minutes, celui-ci n'est pas suffisamment significatif pour évaluer la fonction hépatique. Il semblerait que la captation hépatique de ces Nps soit beaucoup trop faible pour obtenir un ciblage spécifique des ASGP-R observable en IRM.

En comparaison, nous avons observé que la captation hépatique des AGuIX@PEG₂₁₀₀-SH était bien supérieure. Une fois fonctionnalisée par le lactose, les AGuIX@PEG₂₁₀₀@Lactose s'accumulent plus rapidement au niveau du foie. La différence de rehaussement est significative entre 6 et 9 minutes post injection.

Enfin, nous pouvons noter que contrairement aux nanoparticules AGuIX@PEG₂₅₀, qui présentent environ un lactose à leur surface, le taux de greffage du lactose sur les AGuIX@PEG₂₁₀₀-SH est plus important avec environ 2 lactose/Np. Il est alors possible d'envisager un effet de multivalence du lactose pour les récepteurs ASGP-R.

4.4. CONCLUSION

La fonctionnalisation des nanoparticules AGuIX par des chaînes de PEG à haut poids moléculaire permet de modifier leur biodistribution et leur pharmacocinétique. En effet, celles-ci présentent une captation hépatique bien supérieure. Une fois vectorisées par le dérivé lactosylé, ces Nps s'accumulent plus rapidement au niveau du foie avec une différence de contraste significative entre 6 et 9 minutes *post* injection.

Cette différence peut être due à une reconnaissance entre le lactose et les récepteurs d'asialoglycoprotéines présents à la surface des cellules hépatocytes. Toutefois, les profils de rémanence hépatique des AGuIX@PEG₂₁₀₀-SH et des AGuIX@PEG₂₁₀₀@Lactose sont très proches. Les deux types de Nps présentent un plateau jusqu'à 36 minutes *post* injection.

Cette rémanence peut être due non pas aux cellules hépatocytes, mais aux cellules de Kupffer : le deuxième type de cellules les plus présentes dans le foie, mais qui ne participent pas à la fonction hépatique. Pour répondre à ces questions, des expériences d'histologies couplées à la cytométrie en flux sont prévues prochainement.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Avec le vieillissement généralisé de la population, la médecine actuelle doit répondre à de nouveaux enjeux tels que l'augmentation du nombre de cancer ou de pathologies neurodégénératives (i.e. maladie d'Alzheimer ou maladie de Parkinson).

Le recours aux nanotechnologies est apparu comme un outil particulièrement prometteur pour la résolution de ces problématiques. En effet, les nanoparticules présentent des propriétés inédites liées à leur taille. Selon leur composition, leur forme, leur chimie de surface ou encore leur fonctionnalisation par différents composés, elles peuvent agir comme agent thérapeutique et/ou agent d'imagerie. L'équipe FENNEC (Formation et Elaboration de Nanomatériaux et Cristaux) de l'Institut Lumière Matière, développe depuis 2010 de nouvelles nanoparticules alliant à la fois imagerie et thérapie : les AGuIX. Ces Nps sont des agents théranostiques pouvant combiner 3 techniques d'imagerie médicale (IRM, imagerie de fluorescence, et scintigraphie). Leur diamètre hydrodynamique inférieur à 5 nm permet leur élimination par voie rénale. Les différentes études réalisées *in vivo* ont démontré que ces Nps étaient biocompatibles et ne présentaient pas de toxicité. Enfin, de par leur composition en gadolinium ($Z=64$), ces Nps interagissent avec les RX. En s'accumulant de façon passive dans les tumeurs grâce à l'effet EPR, elles permettent d'augmenter l'efficacité d'un traitement de radiothérapie grâce à un effet radiosensibilisant.

Seulement l'effet EPR n'est applicable qu'au ciblage des tumeurs. Pour la détection d'autres pathologies, tels que les amyloïdoses ou le ciblage de certains organes, il est nécessaire de recourir à des stratégies de ciblage actif.

Au cours de la thèse nous nous sommes ainsi intéressés au greffage de différents biovecteurs afin de cibler (i) les plaques amyloïdes, responsables de pathologies telles que la maladie d'Alzheimer, de Parkinson, ou du diabète de type II ; (ii) les cellules hépatocytes du foie. Cette thèse interdisciplinaire a été réalisée en partenariat avec de nombreuses équipes de recherches.

Le principal projet réalisé au cours de la thèse consiste au ciblage actif des plaques amyloïdes. L'amyloïdose représente un groupe de maladie dans lesquelles une protéine perd sa conformation native pour s'agréger sous forme de plaques insolubles dans le milieu extracellulaire. Trois stratégies de ciblage actif de ces dépôts ont été mises en place:

- (i) le greffage de pentapeptides dont le motif est issu de la séquence d'acides aminés de la protéine à l'origine de la maladie : par exemple les peptides LPFFD et KLVFF dans le cas de la maladie d'Alzheimer.

- (ii) l'utilisation d'un dérivé benzothiazole actuellement en développement comme agent TEP : le Pittsburgh Compound B (PIB)
- (iii) le recours au nanobody B10Ap, spécifique de la conformation en protofilaments ou fibres des dépôts amyloïdes.

Ces trois familles de vecteurs présentent toute une amine primaire disponible pour un couplage covalent. Dans un premier temps, nous avons ainsi introduit environ 5 fonctions acides carboxyliques à la surface des Nps AGuIX via l'ajout de bras espaceurs PEG, nous avons pu greffer les différents vecteurs par formation d'une liaison amide. Le greffage de chacun de ces biovecteurs a été caractérisé par des techniques d'analyses complémentaires (DLS, FTIR, relaxométrie, HPLC, analyse élémentaire, méthodes colorimétriques, spectroscopie de fluorescence, ...).

L'affinité de ces Nps vectorisées a été mise en évidence *in vitro* par résonance plasmonique de surface et par fluorescence. Le recours au Biacore nous a ainsi permis de déterminer les constantes de dissociations des différentes Nps ou vecteurs vis à vis de tel ou tel type de fibres. Ces observations ont été confirmées par des expériences d'immunohistochimie sur coupes de cerveau de souris modèles Alzheimer ou TTR.

Il est apparu que les AGuIX@Peptide présentaient une affinité relativement faible pour les fibres A β ($K_D \simeq 500 \mu\text{M}$), en accord avec l'affinité des peptides seuls relatés dans la littérature. L'avantage principal de cette stratégie est qu'elle permet de reconnaître spécifiquement un type de fibres. Actuellement de nouveaux peptides présentant une meilleure affinité pour les fibres sont sélectionnés par l'équipe AFFOND du CEA de Grenoble.

L'affinité pour les fibres amyloïdes est supérieure dans le cas des AGuIX@PIB ($K_D \simeq 5\text{-}15 \mu\text{M}$). De plus, les expériences de partition en fluorescence et d'immunohistochimie sur coupes de souris modèles ont révélé que les AGuIX@PIB permettaient également de reconnaître les dépôts amyloïdes issus des protéines TTR et IAPP, associés à des cardiomyopathies et au diabète de type II respectivement. Ainsi les AGuIX@PIB peuvent agir comme marqueur général des pathologies amyloïdes.

La dernière stratégie mise en place au cours de la thèse fait appel au nanobody couplé à la phosphatase alcaline : le B10Ap. Après couplage aux nanoparticules, nous avons observé par résonance plasmonique de surface et par DOT-Blot que le nanobody conservait sa très forte affinité envers les fibres A β et α -synucléine ($K_D \simeq 5\text{-}15 \text{ nM}$). Ces résultats sont très prometteurs et doivent être mis en évidence *ex vivo* par la future réalisation d'expériences d'histologies.

Prochainement, ces différentes nanoparticules seront testées *in vivo* par IRM et/ou imagerie de fluorescence sur des souris modèles amyloïdes. Dans le cadre d'expériences sur des souris modèles Alzheimer, le passage de la BHE sera réalisé grâce à l'application d'un champ d'ultrasons localisés. La réalisation d'imagerie *in vivo* après injection des nanoparticules AGuIX vectorisées pourra ainsi permettre de mieux comprendre le développement des maladies amyloïdes. Cette stratégie est particulièrement intéressante pour évaluer l'efficacité de nouveaux traitements contre l'évolution de la maladie.

Le deuxième projet réalisé au cours de la thèse consistait au ciblage des récepteurs asialoglycoprotéines des cellules hépatocytes du foie afin d'évaluer la fonction hépatique par IRM. Les nanoparticules AGuIX ont ainsi été fonctionnalisées par un dérivé lactosylé, spécifique des ASGP-R. Dans un premier temps, nous avons directement greffé ce vecteur à la surface des AGuIX@PEG₂₅₀-COOH. Or, la pharmacocinétique des Nps est particulièrement rapide, et après une première circulation dans le flux sanguin, elles s'accumulent au niveau des reins pour être ensuite éliminées de l'organisme. Il en résulte qu'une infime partie des nanoparticules circule dans le foie et que les AGuIX@Lactose ne s'accumulent pas en quantité suffisante au niveau des cellules hépatocytes pour obtenir un contraste significatif en IRM. Pour pallier ce problème, nous avons fonctionnalisé les nanoparticules par des chaînes de PEG à haut poids moléculaire (2100 Da) et observé par IRM une modification de la biodistribution des Nps, avec une rémanence hépatique de 6 à 40 minutes *post* injection. Nous avons également observé que les AGuIX@PEG₂₁₀₀@Lactose s'accumulaient plus rapidement au niveau du foie que les AGuIX@PEG₂₁₀₀-SH. Toutefois, des expériences complémentaires (histologie, cytométrie en flux) doivent être réalisées afin de savoir si les Nps se trouvent bien au niveau des cellules hépatocytes, et ne sont pas retenues par les cellules de Kupffer.

En conclusion, la fonctionnalisation des nanoparticules AGuIX par différents ligands ciblant permet de développer de nouveaux outils d'imagerie ciblant spécifiquement certaines pathologies ou certains récepteurs cellulaires. Cette nouvelle famille d'agents de contraste permettrait de proposer à terme un diagnostic précis et précoce de pathologies spécifiques, avant même l'apparition des premiers symptômes. Cette approche est particulièrement intéressante dans le cadre de la maladie d'Alzheimer où la pathologie apparaît environ 20 ans avant les troubles chez le patient. De manière plus générale, le recours à un diagnostic ciblé permettra à l'avenir de prendre en charge les patients à des stades précoces de leurs pathologies et d'améliorer considérablement l'efficacité de leur traitement.

RÉFÉRENCES

- [1] J. Schulte, Ed., *Nanotechnology: Global Strategies, Industry Trends and Applications*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2005.
- [2] F. Lux, A. Mignot, P. Mowat, C. Louis, S. Dufort, C. Bernhard, F. Denat, F. Boschetti, C. Brunet, R. Antoine, P. Dugourd, S. Laurent, L. V. Elst, R. Muller, L. Sancey, V. Josserand, J.-L. Coll, V. Stupar, E. Barbier, C. Rémy, A. Broisat, C. Ghezzi, G. Le Duc, S. Roux, P. Perriat, and O. Tillement, "Ultrasmall Rigid Particles as Multimodal Probes for Medical Applications," *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 50, no. 51, pp. 12299–12303, Dec. 2011.
- [3] H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, and K. Hori, "Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review," *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*, vol. 65, no. 1–2, pp. 271–284, Mar. 2000.
- [4] L. Sancey, F. Lux, S. Kotb, S. Roux, S. Dufort, A. Bianchi, Y. Crémillieux, P. Fries, J.-L. Coll, C. Rodriguez-Lafrasse, M. Janier, M. Dutreix, M. Barberi-Heyob, F. Boschetti, F. Denat, C. Louis, E. Porcel, S. Lacombe, G. Le Duc, E. Deutsch, J.-L. Perfettini, A. Detappe, C. Verry, R. Berbeco, K. T. Butterworth, S. J. McMahon, K. M. Prise, P. Perriat, and O. Tillement, "The use of theranostic gadolinium-based nanoprobe to improve radiotherapy efficacy," *Br. J. Radiol.*, vol. 87, no. 1041, p. 20140134, Sep. 2014.
- [5] G. L. Duc, S. Roux, A. Paruta-Tuarez, S. Dufort, E. Brauer, A. Marais, C. Truillet, L. Sancey, P. Perriat, F. Lux, and O. Tillement, "Advantages of gadolinium based ultrasmall nanoparticles vs molecular gadolinium chelates for radiotherapy guided by MRI for glioma treatment," *Cancer Nanotechnol.*, vol. 5, no. 1, pp. 1–14, Jul. 2014.
- [6] C. Soto, M. S. Kindy, M. Baumann, and B. Frangione, "Inhibition of Alzheimer's amyloidosis by peptides that prevent β -sheet conformation," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 226, no. 3, pp. 672–680, 1996.
- [7] Lars O. Tjernberg, Jan Näslund, Fredrik Lindqvist, Jan Johansson, Anders R. Karlström, Johan Thyberg, Lars Terenius, and Christer Nordstedt, "Arrest of β -Amyloid Fibril Formation by a Pentapeptide Ligand," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 15, pp. 8545–8548, 1996.
- [8] W. E. Klunk, H. Engler, A. Nordberg, Y. Wang, G. Blomqvist, D. P. Holt, M. Bergström, I. Savitcheva, G.-F. Huang, S. Estrada, and others, "Imaging brain amyloid in Alzheimer's

disease with Pittsburgh Compound-B," *Ann. Neurol.*, vol. 55, no. 3, pp. 306–319, 2004.

[9] G. Habicht, C. Haupt, R. P. Friedrich, P. Hortschansky, C. Sachse, J. Meinhardt, K. Wieligmann, G. P. Gellermann, M. Brodhun, J. Götz, K.-J. Halbhuber, C. Röcken, U. Horn, and M. Fändrich, "Directed selection of a conformational antibody domain that prevents mature amyloid fibril formation by stabilizing Abeta protofibrils," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 49, pp. 19232–19237, Dec. 2007.

[10] H. Zaidi, "Monte Carlo Simulation Studies of Scatter Correction in Positron Emission Tomography," Université de Genève, 2000.

[11] R. Weissleder and M. J. Pittet, "Imaging in the era of molecular oncology," *Nature*, vol. 452, no. 7187, pp. 580–589, Apr. 2008.

[12] C. Boesch, "Molecular aspects of magnetic resonance imaging and spectroscopy," *Mol. Aspects Med.*, vol. 20, no. 4, pp. 185–318, 1999.

[13] L. Helm, A. E. Merbach, and É. Tóth, Eds., *The chemistry of contrast agents in medical magnetic resonance imaging*, Second edition. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Inc, 2013.

[14] C. F. G. C. Geraldes and S. Laurent, "Classification and basic properties of contrast agents for magnetic resonance imaging," *Contrast Media Mol. Imaging*, vol. 4, no. 1, pp. 1–23, Jan. 2009.

[15] E. Ledneva, N. Janus, S. Amet, V. Launay-Vacher, and G. Deray, "Toxicités des chélates de gadolinium chez le patient insuffisant rénal," *Sang Thromb. Vaiss.*, no. 2, pp. 90–95, Feb. 2010.

[16] R. A. Natalin, M. R. Prince, M. E. Grossman, D. Silvers, and J. Landman, "Contemporary applications and limitations of magnetic resonance imaging contrast materials," *J. Urol.*, vol. 183, no. 1, pp. 27–33, Jan. 2010.

[17] A. D. Sherry, P. Caravan, and R. E. Lenkinski, "Primer on gadolinium chemistry," *J. Magn. Reson. Imaging*, vol. 30, no. 6, pp. 1240–1248, Dec. 2009.

[18] J. J. Pasternak and E. E. Williamson, "Clinical Pharmacology, Uses, and Adverse Reactions of Iodinated Contrast Agents: A Primer for the Non-radiologist," *Mayo Clin. Proc.*,

vol. 87, no. 4, pp. 390–402, Apr. 2012.

[19] L. Cunha, I. Horvath, S. Ferreira, J. Lemos, P. Costa, D. Vieira, D. S. Veres, K. Szigeti, T. Summavielle, D. Máthé, and L. F. Metello, “Preclinical Imaging: an Essential Ally in Modern Biosciences,” *Mol. Diagn. Ther.*, vol. 18, no. 2, pp. 153–173, Apr. 2014.

[20] M. Vorster, A. Maes, C. Van deWiele, and M. Sathekge, “Gallium-68: a systematic review of its nononcological applications,” *Nucl. Med. Commun.*, vol. 34, no. 9, pp. 834–854, Sep. 2013.

[21] M. E. Phelps, “Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 97, no. 16, pp. 9226–9233, Aug. 2000.

[22] A. Rahmim and H. Zaidi, “PET versus SPECT: strengths, limitations and challenges,” *Nucl. Med. Commun.*, vol. 29, no. 3, pp. 193–207, Mar. 2008.

[23] R. W. Cootney, “Ultrasound Imaging: Principles and Applications in Rodent Research,” *ILAR J.*, vol. 42, no. 3, pp. 233–247, Jan. 2001.

[24] F. Kiessling, S. Fokong, J. Bzyl, W. Lederle, M. Palmowski, and T. Lammers, “Recent advances in molecular, multimodal and theranostic ultrasound imaging,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 72, pp. 15–27, Jun. 2014.

[25] K. Nouri, *Handbook of lasers in dermatology*. 2014.

[26] V. J. Pansare, S. Hejazi, W. J. Faenza, and R. K. Prud’homme, “Review of Long-Wavelength Optical and NIR Imaging Materials: Contrast Agents, Fluorophores, and Multifunctional Nano Carriers,” *Chem. Mater.*, vol. 24, no. 5, pp. 812–827, Mar. 2012.

[27] F. P. R. Verbeek, J. R. van der Vorst, Q. R. J. G. Tummers, M. C. Boonstra, K. E. de Rooij, C. W. G. M. Löwik, A. R. P. M. Valentijn, C. J. H. van de Velde, H. S. Choi, J. V. Frangioni, and A. L. Vahrmeijer, “Near-Infrared Fluorescence Imaging of Both Colorectal Cancer and Ureters Using a Low-Dose Integrin Targeted Probe,” *Ann. Surg. Oncol.*, vol. 21, no. S4, pp. 528–537, Dec. 2014.

[28] N. Haj-Hosseini, P. Behm, I. Shabo, and K. Wårdell, “Fluorescence spectroscopy using indocyanine green for lymph node mapping,” 2014, p. 893504.

- [29] J. Czernin, M. Allen-Auerbach, and H. R. Schelbert, "Improvements in cancer staging with PET/CT: literature-based evidence as of September 2006," *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 48 Suppl 1, p. 78S–88S, Jan. 2007.
- [30] V. Quan, L. Ho, R. Montion, P. Contreras, K. O' Leary, K. Lee, and R. Henderson, "Assessment of radiation exposure from CT during PET/CT imaging," *Soc. Nucl. Med. Annu. Meet. Abstr.*, vol. 48, no. MeetingAbstracts_2, p. 439P–a, May 2007.
- [31] B. J. Pichler, H. F. Wehrl, A. Kolb, and M. S. Judenhofer, "Positron emission tomography/magnetic resonance imaging: the next generation of multimodality imaging?," *Semin. Nucl. Med.*, vol. 38, no. 3, pp. 199–208, May 2008.
- [32] L. Martí-Bonmatí, R. Sopena, P. Bartumeus, and P. Sopena, "Multimodality imaging techniques," *Contrast Media Mol. Imaging*, vol. 5, no. 4, pp. 180–189, Jul. 2010.
- [33] B. H. Hasegawa, E. L. Gingold, S. M. Reilly, S.-C. Liew, and C. E. Cann, "Description of a simultaneous emission-transmission CT system," 1990, pp. 50–60.
- [34] S. C. Davis, B. W. Pogue, R. Springett, C. Leussler, P. Mazurkewitz, S. B. Tuttle, S. L. Gibbs-Strauss, S. S. Jiang, H. Dehghani, and K. D. Paulsen, "Magnetic resonance–coupled fluorescence tomography scanner for molecular imaging of tissue," *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 79, no. 6, p. 064302, 2008.
- [35] J. Morlieras, "Fonctionnalisation de nanoparticules à base de gadolinium à visée thérapeutique," 2013.
- [36] G. Bao, S. Mitragotri, and S. Tong, "Multifunctional Nanoparticles for Drug Delivery and Molecular Imaging," *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 15, no. 1, pp. 253–282, Jul. 2013.
- [37] M. A. Hahn, A. K. Singh, P. Sharma, S. C. Brown, and B. M. Moudgil, "Nanoparticles as contrast agents for in-vivo bioimaging: current status and future perspectives," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 399, no. 1, pp. 3–27, Jan. 2011.
- [38] A.-H. Lu, E. L. Salabas, and F. Schüth, "Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application," *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 46, no. 8, pp. 1222–1244, Feb. 2007.

- [39] J. Estelrich, E. Escribano, J. Queralt, and M. Busquets, "Iron Oxide Nanoparticles for Magnetically-Guided and Magnetically-Responsive Drug Delivery," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 4, pp. 8070–8101, Apr. 2015.
- [40] R. C. Semelka and T. K. Helmberger, "Contrast agents for MR imaging of the liver," *Radiology*, vol. 218, no. 1, pp. 27–38, Jan. 2001.
- [41] M. G. Harisinghani, J. Barentsz, P. F. Hahn, W. M. Deserno, S. Tabatabaei, C. H. van de Kaa, J. de la Rosette, and R. Weissleder, "Noninvasive Detection of Clinically Occult Lymph-Node Metastases in Prostate Cancer," *N. Engl. J. Med.*, vol. 348, no. 25, pp. 2491–2499, Jun. 2003.
- [42] J.-P. Fortin, C. Wilhelm, J. Servais, C. Ménager, J.-C. Bacri, and F. Gazeau, "Size-Sorted Anionic Iron Oxide Nanomagnets as Colloidal Mediators for Magnetic Hyperthermia," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, no. 9, pp. 2628–2635, Mar. 2007.
- [43] P. K. Jain, K. S. Lee, I. H. El-Sayed, and M. A. El-Sayed, "Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size, Shape, and Composition: Applications in Biological Imaging and Biomedicine," *J. Phys. Chem. B*, vol. 110, no. 14, pp. 7238–7248, Apr. 2006.
- [44] J. F. Hainfeld, L. Lin, D. N. Slatkin, F. Avraham Dilmanian, T. M. Vadas, and H. M. Smilowitz, "Gold nanoparticle hyperthermia reduces radiotherapy dose," *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.*, vol. 10, no. 8, pp. 1609–1617, Nov. 2014.
- [45] D. Xi, S. Dong, X. Meng, Q. Lu, L. Meng, and J. Ye, "Gold nanoparticles as computerized tomography (CT) contrast agents," *RSC Adv.*, vol. 2, no. 33, p. 12515, 2012.
- [46] D. B. Chithrani, S. Jelveh, F. Jalali, M. van Prooijen, C. Allen, R. G. Bristow, R. P. Hill, and D. A. Jaffray, "Gold Nanoparticles as Radiation Sensitizers in Cancer Therapy," *Radiat. Res.*, vol. 173, no. 6, pp. 719–728, Feb. 2010.
- [47] R. Byers and E. Tholouli, "Multiplexed Bioimaging Using Quantum Dots," in *Nanotechnologies for the Life Sciences*, C. S. S. R. Kumar, Ed. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011.

- [48] I. L. Medintz, H. T. Uyeda, E. R. Goldman, and H. Mattoussi, "Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing," *Nat. Mater.*, vol. 4, no. 6, pp. 435–446, Jun. 2005.
- [49] M.-K. So, A. M. Loening, S. S. Gambhir, and J. Rao, "Creating self-illuminating quantum dot conjugates," *Nat. Protoc.*, vol. 1, no. 3, pp. 1160–1164, 2006.
- [50] W. Cai, A. R. Hsu, Z.-B. Li, and X. Chen, "Are quantum dots ready for in vivo imaging in human subjects?," *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 2, no. 6, pp. 265–281, Jun. 2007.
- [51] A. M. Smith, S. Dave, S. Nie, L. True, and X. Gao, "Multicolor quantum dots for molecular diagnostics of cancer," *Expert Rev. Mol. Diagn.*, vol. 6, no. 2, pp. 231–244, Mar. 2006.
- [52] R. Liang, M. Wei, D. G. Evans, and X. Duan, "Inorganic nanomaterials for bioimaging, targeted drug delivery and therapeutics," *Chem Commun*, vol. 50, no. 91, pp. 14071–14081, Jun. 2014.
- [53] M. Liong, J. Lu, M. Kovochich, T. Xia, S. G. Ruehm, A. E. Nel, F. Tamanoi, and J. I. Zink, "Multifunctional Inorganic Nanoparticles for Imaging, Targeting, and Drug Delivery," *ACS Nano*, vol. 2, no. 5, pp. 889–896, May 2008.
- [54] A. Baeza, M. Colilla, and M. Vallet-Regí, "Advances in mesoporous silica nanoparticles for targeted stimuli-responsive drug delivery," *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 12, no. 2, pp. 319–337, Feb. 2015.
- [55] S. E. McNeil, "Nanoparticle therapeutics: a personal perspective," *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, vol. 1, no. 3, pp. 264–271, Jun. 2009.
- [56] M. Longmire, P. L. Choyke, and H. Kobayashi, "Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats," *Nanomed.*, vol. 3, no. 5, pp. 703–717, Oct. 2008.
- [57] H. Otsuka, Y. Nagasaki, and K. Kataoka, "PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 55, no. 3, pp. 403–419, Feb. 2003.
- [58] M. L. James and S. S. Gambhir, "A Molecular Imaging Primer: Modalities, Imaging

Agents, and Applications,” *Physiol. Rev.*, vol. 92, no. 2, pp. 897–965, Apr. 2012.

[59] D. Kozlova and M. Epple, “Biological targeting with nanoparticles: state of the art,” *BioNanoMaterials*, vol. 14, no. 3–4, Jan. 2013.

[60] H. Kobayashi, R. Watanabe, and P. L. Choyke, “Improving Conventional Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effects; What Is the Appropriate Target?,” *Theranostics*, vol. 4, no. 1, pp. 81–89, Dec. 2013.

[61] V. P. Torchilin, Ed., *Handbook of targeted delivery of imaging agents*. Boca Raton: CRC Press, 1995.

[62] S. Lee, J. Xie, and X. Chen, “Peptides and peptide hormones for molecular imaging and disease diagnosis,” *Chem. Rev.*, vol. 110, no. 5, pp. 3087–3111, May 2010.

[63] G. Mondal, S. Barui, and A. Chaudhuri, “The relationship between the cyclic-RGDfK ligand and $\alpha\beta_3$ integrin receptor,” *Biomaterials*, vol. 34, no. 26, pp. 6249–6260, Aug. 2013.

[64] P. R. Bouchard, R. M. Hutabarat, and K. M. Thompson, “Discovery and development of therapeutic aptamers,” *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 50, pp. 237–257, 2010.

[65] S. A. Doggrel, “Pegaptanib: the first antiangiogenic agent approved for neovascular macular degeneration,” *Expert Opin. Pharmacother.*, vol. 6, no. 8, pp. 1421–1423, Jul. 2005.

[66] C. Hamers-Casterman, T. Atarhouch, S. Muyldermans, G. Robinson, C. Hammers, E. B. Songa, N. Bendahman, and R. Hammers, “Naturally occurring antibodies devoid of light chains,” *Nature*, vol. 363, no. 6428, pp. 446–448, Jun. 1993.

[67] N. Kamaly, Z. Xiao, P. M. Valencia, A. F. Radovic-Moreno, and O. C. Farokhzad, “Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, no. 7, p. 2971, 2012.

[68] A. Mignot, C. Truillet, F. Lux, L. Sancey, C. Louis, F. Denat, F. Boschetti, L. Bocher, A. Gloter, and O. Stéphan, “A Top-Down Synthesis Route to Ultrasmall Multifunctional Gd-Based Silica Nanoparticles for Theranostic Applications,” *Chem.-Eur. J.*, vol. 19, no. 19, pp. 6122–6136, 2013.

- [69] A. Mignot, "A top-down synthesis route to ultrasmall multifunctional Gd-based silica nanoparticles for theranostic applications.," Université Claude Bernard, Lyon 1, Villeurbanne, 2012.
- [70] A. Bianchi, S. Dufort, F. Lux, A. Courtois, O. Tillement, J.-L. Coll, and Y. Crémillieux, "Quantitative biodistribution and pharmacokinetics of multimodal gadolinium-based nanoparticles for lungs using ultrashort TE MRI," *Magma N. Y. N.*, vol. 27, no. 4, pp. 303–316, Aug. 2014.
- [71] L. Sancey, S. Kotb, C. Truillet, F. Appaix, A. Marais, E. Thomas, B. van der Sanden, J.-P. Klein, B. Laurent, M. Cottier, R. Antoine, P. Dugourd, G. Panczer, F. Lux, P. Perriat, V. Motto-Ros, and O. Tillement, "Long-Term *in Vivo* Clearance of Gadolinium-Based AGuIX Nanoparticles and Their Biocompatibility after Systemic Injection," *ACS Nano*, vol. 9, no. 3, pp. 2477–2488, Mar. 2015.
- [72] M. Botta and L. Tei, "Relaxivity Enhancement in Macromolecular and Nanosized GdIII-Based MRI Contrast Agents," *Eur. J. Inorg. Chem.*, vol. 2012, no. 12, pp. 1945–1960, Apr. 2012.
- [73] G. T. Hermanson, *Bioconjugate techniques*. Amsterdam: Academic Press, 2008.
- [74] J. Conde, J. T. Dias, V. Graça, M. Moros, P. V. Baptista, and J. M. de la Fuente, "Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine," *Front. Chem.*, vol. 2, Jul. 2014.
- [75] C. TRUILLET, F. LUX, S. ROUX, P. PERRIAT, and O. TILLEMENT, "Nanosondes hybrides multimodales pour applications médicales," *Tech. Ing. Nanotechnologies Pour L'énergie Santé Agroaliment.*, vol. base documentaire : TIB514DUO., no. ref. article : nm4020, 2015.
- [76] A. F. Habeeb, "Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid," *Anal. Biochem.*, vol. 14, no. 3, pp. 328–336, Mar. 1966.
- [77] M. L. Kakade and I. E. Liener, "Determination of available lysine in proteins," *Anal. Biochem.*, vol. 27, no. 2, pp. 273–280, Feb. 1969.
- [78] R. B. Sashidhar, A. K. Capoor, and D. Ramana, "Quantitation of ϵ -amino group using

amino acids as reference standards by trinitrobenzene sulfonic acid: A simple spectrophotometric method for the estimation of hapten to carrier protein ratio," *J. Immunol. Methods*, vol. 167, no. 1–2, pp. 121–127, Jan. 1994.

[79] C. A. G. N. Montalbetti and V. Falque, "Amide bond formation and peptide coupling," *Tetrahedron*, vol. 61, no. 46, pp. 10827–10852, Nov. 2005.

[80] B. S. Jursic and Z. Zdravkovski, "A Simple Preparation of Amides from Acids and Amines by Heating of Their Mixture," *Synth. Commun.*, vol. 23, no. 19, pp. 2761–2770, Nov. 1993.

[81] A. El-Faham and F. Albericio, "Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup," *Chem. Rev.*, vol. 111, no. 11, pp. 6557–6602, Nov. 2011.

[82] M. J. E. Fischer, "Amine Coupling Through EDC/NHS: A Practical Approach," in *Surface Plasmon Resonance*, vol. 627, N. J. Mol and M. J. E. Fischer, Eds. Totowa, NJ: Humana Press, 2010, pp. 55–73.

[83] Z. Grabarek and J. Gergely, "Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters," *Anal. Biochem.*, vol. 185, no. 1, pp. 131–135, Feb. 1990.

[84] J. V. Staros, R. W. Wright, and D. M. Swingle, "Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions," *Anal. Biochem.*, vol. 156, no. 1, pp. 220–222, Jul. 1986.

[85] S. Kida, M. Maeda, K. Hojo, Y. Eto, S. Nakagawa, and K. Kawasakia, "Studies on Heterobifunctional Cross-Linking Reagents, 6-Maleimidohexanoic Acid Active Esters," *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, vol. 55, no. 4, pp. 685–687, 2007.

[86] K. Sakurai, T. M. Snyder, and D. R. Liu, "DNA-Templated Functional Group Transformations Enable Sequence-Programmed Synthesis Using Small-Molecule Reagents," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 6, pp. 1660–1661, Feb. 2005.

[87] F. C. Hartman and F. Wold, "Bifunctional Reagents. Cross-Linking of Pancreatic Ribonuclease with a Diimido Ester ¹," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 88, no. 16, pp. 3890–3891, Aug. 1966.

- [88] "Infrared Spectroscopy of Natural Organic Molecules." <http://geoweb.princeton.edu/research/geochemistry/research/organics-carboxyl.html>. Consulté le 7 Juillet 2015.
- [89] B. Stuart, *Infrared spectroscopy: fundamentals and applications*. Chichester, West Sussex, England ; Hoboken, NJ: J. Wiley, 2004.
- [90] J. A. Burns, J. C. Butler, J. Moran, and G. M. Whitesides, "Selective reduction of disulfides by tris(2-carboxyethyl)phosphine," *J. Org. Chem.*, vol. 56, no. 8, pp. 2648–2650, Apr. 1991.
- [91] R. R. Traut, A. Bollen, T.-T. Sun, J. W. B. Hershey, J. Sundberg, and L. R. Pierce, "Methyl 4-mercaptobutyrimidate as a cleavable crosslinking reagent and its application to the Escherichia coli 30S ribosome," *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 12, no. 17, pp. 3266–3273, Aug. 1973.
- [92] P. W. Riddles, R. L. Blakeley, and B. Zerner, "Ellman's reagent: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)--a reexamination," *Anal. Biochem.*, vol. 94, no. 1, pp. 75–81, Apr. 1979.
- [93] G. L. Ellman, "Tissue sulfhydryl groups," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 82, no. 1, pp. 70–77, May 1959.
- [94] N. K. Kella, D. D. Roberts, J. A. Shafer, and I. J. Goldstein, "Fluorescence energy transfer studies on lima bean lectin. Distance between the subunit hydrophobic binding site and the thiol group essential for carbohydrate binding," *J. Biol. Chem.*, vol. 259, no. 8, pp. 4777–4781, Apr. 1984.
- [95] J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*. New York: Springer, 2006.
- [96] J. R. Albani, *Principles and applications of fluorescence spectroscopy*. Oxford; Ames, Iowa: Blackwell Science, 2007.
- [97] H. S. Choi, K. Nasr, S. Alyabyev, D. Feith, J. H. Lee, S. H. Kim, Y. Ashitate, H. Hyun, G. Patonay, L. Strekowski, M. Henary, and J. V. Frangioni, "Synthesis and In Vivo Fate of Zwitterionic Near-Infrared Fluorophores," *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 50, no. 28, pp. 6258–6263, Jul. 2011.

- [98] M. Cooper, A. Ebner, M. Briggs, M. Burrows, N. Gardner, R. Richardson, and R. West, "Cy3B: improving the performance of cyanine dyes," *J. Fluoresc.*, vol. 14, no. 2, pp. 145–150, Mar. 2004.
- [99] A. Bianchi, D. Moncelet, F. Lux, M. Plissonneau, S. Rizzitelli, E. J. Ribot, N. Tassali, V. Bouchaud, O. Tillement, P. Voisin, and Y. Crémillieux, "Orotracheal administration of contrast agents: a new protocol for brain tumor targeting: A New Protocol to Target Brain Cancer," *NMR Biomed.*, vol. 28, no. 6, pp. 738–746, Jun. 2015.
- [100] B. Dubois, H. H. Feldman, C. Jacova, S. T. Dekosky, P. Barberger-Gateau, J. Cummings, A. Delacourte, D. Galasko, S. Gauthier, G. Jicha, K. Meguro, J. O'brien, F. Pasquier, P. Robert, M. Rossor, S. Salloway, Y. Stern, P. J. Visser, and P. Scheltens, "Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria," *Lancet Neurol.*, vol. 6, no. 8, pp. 734–746, Aug. 2007.
- [101] F. Mangialasche, A. Solomon, B. Winblad, P. Mecocci, and M. Kivipelto, "Alzheimer's disease: clinical trials and drug development," *Lancet Neurol.*, vol. 9, no. 7, pp. 702–716, Jul. 2010.
- [102] P. D. Meek, K. McKeithan, and G. T. Schumock, "Economic considerations in Alzheimer's disease," *Pharmacotherapy*, vol. 18, no. 2 Pt 2, pp. 68–73; discussion 79–82, Apr. 1998.
- [103] L. I. Binder, A. L. Guillozet-Bongaarts, F. Garcia-Sierra, and R. W. Berry, "Tau, tangles, and Alzheimer's disease," *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.*, vol. 1739, no. 2–3, pp. 216–223, Jan. 2005.
- [104] J. Hardy and D. J. Selkoe, "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics," *Science*, vol. 297, no. 5580, pp. 353–356, Jul. 2002.
- [105] J. D. Sipe, M. D. Benson, J. N. Buxbaum, S. Ikeda, G. Merlini, M. J. M. Saraiva, and P. Westermark, "Nomenclature 2014: Amyloid fibril proteins and clinical classification of the amyloidosis," *Amyloid*, vol. 21, no. 4, pp. 221–224, Dec. 2014.
- [106] S.-Y. Ow and D. E. Dunstan, "A brief overview of amyloids and Alzheimer's disease:

- Amyloids and Alzheimer's Disease," *Protein Sci.*, vol. 23, no. 10, pp. 1315–1331, Oct. 2014.
- [107] G. Merlini and V. Bellotti, "Molecular mechanisms of amyloidosis," *N. Engl. J. Med.*, vol. 349, no. 6, pp. 583–596, 2003.
- [108] F. Chiti and C. M. Dobson, "Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 75, no. 1, pp. 333–366, Jun. 2006.
- [109] M. Di Carlo, D. Giacomazza, and P. L. San Biagio, "Alzheimer's disease: biological aspects, therapeutic perspectives and diagnostic tools," *J. Phys. Condens. Matter Inst. Phys. J.*, vol. 24, no. 24, p. 244102, Jun. 2012.
- [110] P. M. Harrison, "Conformational propagation with prion-like characteristics in a simple model of protein folding," *Protein Sci.*, vol. 10, no. 4, pp. 819–835, Apr. 2001.
- [111] T. Takeda and D. K. Klimov, "Temperature-Induced Dissociation of A β Monomers from Amyloid Fibril," *Biophys. J.*, vol. 95, no. 4, pp. 1758–1772, Aug. 2008.
- [112] V. Wilquet and B. D. Strooper, "Amyloid-beta precursor protein processing in neurodegeneration," *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 14, no. 5, pp. 582–588, Oct. 2004.
- [113] C. Priller, T. Bauer, G. Mitteregger, B. Krebs, H. A. Kretschmar, and J. Herms, "Synapse Formation and Function Is Modulated by the Amyloid Precursor Protein," *J. Neurosci.*, vol. 26, no. 27, pp. 7212–7221, Jul. 2006.
- [114] P. R. Turner, K. O'Connor, W. P. Tate, and W. C. Abraham, "Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory," *Prog. Neurobiol.*, vol. 70, no. 1, pp. 1–32, May 2003.
- [115] J. A. Duce, A. Tsatsanis, M. A. Cater, S. A. James, E. Robb, K. Wikke, S. L. Leong, K. Perez, T. Johanssen, M. A. Greenough, H.-H. Cho, D. Galatis, R. D. Moir, C. L. Masters, C. McLean, R. E. Tanzi, R. Cappai, K. J. Barnham, G. D. Ciccotosto, J. T. Rogers, and A. I. Bush, "Iron-Export Ferroxidase Activity of β -Amyloid Precursor Protein Is Inhibited by Zinc in Alzheimer's Disease," *Cell*, vol. 142, no. 6, pp. 857–867, Sep. 2010.
- [116] B. Vestergaard, M. Groenning, M. Roessle, J. S. Kastrup, M. van de Weert, J. M. Flink, S. Frokjaer, M. Gajhede, and D. I. Svergun, "A Helical Structural Nucleus Is the Primary

Elongating Unit of Insulin Amyloid Fibrils,” *PLoS Biol.*, vol. 5, no. 5, p. e134, 2007.

[117] B. O’Nuallain, S. Shivaprasad, I. Kheterpal, and R. Wetzel, “Thermodynamics of A beta(1-40) amyloid fibril elongation,” *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 44, no. 38, pp. 12709–12718, Sep. 2005.

[118] A. M. Morris, M. A. Watzky, J. N. Agar, and R. G. Finke, “Fitting neurological protein aggregation kinetic data via a 2-step, minimal/‘Ockham’s razor’ model: the Finke-Watzky mechanism of nucleation followed by autocatalytic surface growth,” *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 47, no. 8, pp. 2413–2427, Feb. 2008.

[119] S. Xu, “Aggregation drives ‘misfolding’ in protein amyloid fiber formation,” *Amyloid*, vol. 14, no. 2, pp. 119–131, Jan. 2007.

[120] L. M. Dember, “Amyloidosis-Associated Kidney Disease,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 17, no. 12, pp. 3458–3471, Nov. 2006.

[121] M. B. Pepys, “Amyloidosis,” *Annu. Rev. Med.*, vol. 57, pp. 223–241, 2006.

[122] A. G. Siqueira-Filho, C. L. Cunha, A. J. Tajik, J. B. Seward, T. T. Schattenberg, and E. R. Giuliani, “M-mode and two-dimensional echocardiographic features in cardiac amyloidosis,” *Circulation*, vol. 63, no. 1, pp. 188–196, Jan. 1981.

[123] M. P. Lambert, A. K. Barlow, B. A. Chromy, C. Edwards, R. Freed, M. Liosatos, T. E. Morgan, I. Rozovsky, B. Trommer, K. L. Viola, P. Wals, C. Zhang, C. E. Finch, G. A. Krafft, and W. L. Klein, “Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 11, pp. 6448–6453, May 1998.

[124] V. Chauhan and A. Chauhan, “Oxidative stress in Alzheimer’s disease,” *Pathophysiology*, vol. 13, no. 3, pp. 195–208, Aug. 2006.

[125] H. L. Weiner and D. Frenkel, “Immunology and immunotherapy of Alzheimer’s disease,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 6, no. 5, pp. 404–416, May 2006.

[126] K. Blennow, M. J. de Leon, and H. Zetterberg, “Alzheimer’s disease,” *Lancet*, vol. 368, no. 9533, pp. 387–403, Jul. 2006.

- [127] L. Davies, B. Wolska, C. Hilbich, G. Multhaup, R. Martins, G. Simms, K. Beyreuther, and C. L. Masters, "A4 amyloid protein deposition and the diagnosis of Alzheimer's disease: prevalence in aged brains determined by immunocytochemistry compared with conventional neuropathologic techniques," *Neurology*, vol. 38, no. 11, pp. 1688–1693, Nov. 1988.
- [128] W. Jagust, "Positron emission tomography and magnetic resonance imaging in the diagnosis and prediction of dementia," *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.*, vol. 2, no. 1, pp. 36–42, Jan. 2006.
- [129] R. B. M. Schasfoort and A. J. Tudos, Eds., *Handbook of Surface Plasmon Resonance*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2008.
- [130] A. M. Hutchinson, "Evanescent wave biosensors. Real-time analysis of biomolecular interactions," *Mol. Biotechnol.*, vol. 3, no. 1, pp. 47–54, Feb. 1995.
- [131] F. Markey, "What is SPR anyway?," *Biajournal*, volume 1, pp. 14–17, 1999.
- [132] Y. Tang, X. Zeng, and J. Liang, "Surface Plasmon Resonance: An Introduction to a Surface Spectroscopy Technique," *J. Chem. Educ.*, vol. 87, no. 7, pp. 742–746, Jul. 2010.
- [133] K. J. Vinoy, G. K. Ananthasuresh, R. Pratap, and S. B. Krupanidhi, *Micro and smart devices and systems*. 2014.
- [134] J. G. Quinn, S. O'Neill, A. Doyle, C. McAtamney, D. Diamond, B. D. MacCraith, and R. O'Kennedy, "Development and Application of Surface Plasmon Resonance-Based Biosensors for the Detection of Cell–Ligand Interactions," *Anal. Biochem.*, vol. 281, no. 2, pp. 135–143, Jun. 2000.
- [135] E. Stenberg, B. Persson, H. Roos, and C. Urbaniczky, "Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 143, no. 2, pp. 513–526, May 1991.
- [136] T. Ghosh, L. Williams, and C. H. Mastrangelo, "Label-free detection of protein binding with multisine SPR microchips," *Lab. Chip*, vol. 11, no. 24, p. 4194, 2011.
- [137] W. W. Chen, M. Niepel, and P. K. Sorger, "Classic and contemporary approaches to

modeling biochemical reactions,” *Genes Dev.*, vol. 24, no. 17, pp. 1861–1875, Sep. 2010.

[138] K. Hasegawa, K. Ono, M. Yamada, and H. Naiki, “Kinetic Modeling and Determination of Reaction Constants of Alzheimer’s β -Amyloid Fibril Extension and Dissociation Using Surface Plasmon Resonance [†],” *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 41, no. 46, pp. 13489–13498, Nov. 2002.

[139] N. J. Greenfield, “Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure,” *Nat. Protoc.*, vol. 1, no. 6, pp. 2876–2890, Jan. 2007.

[140] L. Whitmore and B. A. Wallace, “Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases,” *Biopolymers*, vol. 89, no. 5, pp. 392–400, May 2008.

[141] H. Puchtler, F. Sweat, and M. Levine, “ON THE BINDING OF CONGO RED BY AMYLOID,” *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 10, no. 3, pp. 355–364, May 1962.

[142] I. Maezawa, H.-S. Hong, R. Liu, C.-Y. Wu, R. H. Cheng, M.-P. Kung, H. F. Kung, K. S. Lam, S. Oddo, F. M. Laferla, and L.-W. Jin, “Congo red and thioflavin-T analogs detect Abeta oligomers,” *J. Neurochem.*, vol. 104, no. 2, pp. 457–468, Jan. 2008.

[143] C. Hilbich, B. Kisters-Woike, J. Reed, C. L. Masters, and K. Beyreuther, “Substitutions of hydrophobic amino acids reduce the amyloidogenicity of Alzheimer’s disease beta A4 peptides,” *J. Mol. Biol.*, vol. 228, no. 2, pp. 460–473, Nov. 1992.

[144] M. M. Pallitto, J. Ghanta, P. Heinzelman, L. L. Kiessling, and R. M. Murphy, “Recognition sequence design for peptidyl modulators of beta-amyloid aggregation and toxicity,” *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 38, no. 12, pp. 3570–3578, Mar. 1999.

[145] C. W. Cairo, A. Strzelec, R. M. Murphy, and L. L. Kiessling, “Affinity-Based Inhibition of β -Amyloid Toxicity [†],” *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 41, no. 27, pp. 8620–8629, Jul. 2002.

[146] S. J. Wood, R. Wetzel, J. D. Martin, and M. R. Hurle, “Prolines and amyloidogenicity in fragments of the Alzheimer’s peptide beta/A4,” *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 34, no. 3, pp. 724–730, Jan. 1995.

[147] C. Soto, E. M. Sigurdsson, L. Morelli, R. Asok Kumar, E. M. Castaño, and B. Frangione,

“ β -sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: Implications for Alzheimer’s therapy,” *Nat. Med.*, vol. 4, no. 7, pp. 822–826, Jul. 1998.

[148] J. Liu, W. Wang, Q. Zhang, S. Zhang, and Z. Yuan, “Study on the Efficiency and Interaction Mechanism of a Decapeptide Inhibitor of β -Amyloid Aggregation,” *Biomacromolecules*, vol. 15, no. 3, pp. 931–939, Mar. 2014.

[149] N. J. Greenfield, “Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure,” *Nat. Protoc.*, vol. 1, no. 6, pp. 2876–2890, Jan. 2007.

[150] R. Karisson, H. Roos, J. Bruno, and L. Stolz, “Practical aspects concerning direct detection of low molecular weight analytes using BIACORE® 2000,” vol. Special Issue, p. 18, 1997.

[151] S. M. Oliveira, C. A. Ribeiro, I. Cardoso, and M. J. Saraiva, “Gender-dependent transthyretin modulation of brain amyloid- β levels: evidence from a mouse model of Alzheimer’s disease,” *J. Alzheimers Dis. JAD*, vol. 27, no. 2, pp. 429–439, 2011.

[152] P. S. Vassar and C. F. Culling, “Fluorescent stains, with special reference to amyloid and connective tissues,” *Arch. Pathol.*, vol. 68, pp. 487–498, Nov. 1959.

[153] H. LeVine, “Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T,” *Methods Enzymol.*, vol. 309, pp. 274–284, 1999.

[154] A. Reinke, “Conformation-Specific Chemical probes for Amyloid-Beta,” University of Michigan, 2011.

[155] A. Srivastava, P. K. Singh, M. Kumbhakar, T. Mukherjee, S. Chattopadhyay, H. Pal, and S. Nath, “Identifying the bond responsible for the fluorescence modulation in an amyloid fibril sensor,” *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.*, vol. 16, no. 30, pp. 9257–9263, Aug. 2010.

[156] M. Biancalana and S. Koide, “Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils,” *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics*, vol. 1804, no. 7, pp. 1405–1412, Jul. 2010.

[157] M. Groenning, “Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils—current status,” *J. Chem. Biol.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–18, Mar. 2010.

- [158] S. J. Jung, Y. D. Park, J. H. Park, S. D. Yang, M. G. Hur, and K. H. Yu, "Synthesis and evaluation of thioflavin-T analogs as potential imaging agents for amyloid plaques," *Med. Chem. Res.*, vol. 22, no. 9, pp. 4263–4268, Sep. 2013.
- [159] J. C. Price, W. E. Klunk, B. J. Lopresti, X. Lu, J. A. Hoge, S. K. Ziolk, D. P. Holt, C. C. Meltzer, S. T. DeKosky, and C. A. Mathis, "Kinetic modeling of amyloid binding in humans using PET imaging and Pittsburgh Compound-B," *J. Cereb. Blood Flow 38 Metab.*, vol. 25, no. 11, pp. 1528–1547, Nov. 2005.
- [160] C. A. Mathis, Y. Wang, D. P. Holt, G.-F. Huang, M. L. Debnath, and W. E. Klunk, "Synthesis and Evaluation of ^{11}C -Labeled 6-Substituted 2-Arylbenzothiazoles as Amyloid Imaging Agents," *J. Med. Chem.*, vol. 46, no. 13, pp. 2740–2754, Jun. 2003.
- [161] W. E. Klunk, H. Engler, A. Nordberg, Y. Wang, G. Blomqvist, D. P. Holt, M. Bergström, I. Savitcheva, G.-F. Huang, and S. Estrada, "Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B," *Ann. Neurol.*, vol. 55, no. 3, pp. 306–319, 2004.
- [162] A. F. Martins, J.-F. Morfin, A. Kubíčková, V. Kubíček, F. Buron, F. Suzenet, M. Salerno, A. N. Lazar, C. Duyckaerts, N. Arlicot, D. Guilloteau, C. F. G. C. Geraldès, and É. Tóth, "PiB-Conjugated, Metal-Based Imaging Probes: Multimodal Approaches for the Visualization of β -Amyloid Plaques," *ACS Med. Chem. Lett.*, vol. 4, no. 5, pp. 436–440, May 2013.
- [163] A. F. Martins, J.-F. Morfin, C. F. Geraldès, and E. Tóth, "Gd $^{3+}$ complexes conjugated to Pittsburgh compound B: potential MRI markers of β -amyloid plaques," *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 19, no. 2, pp. 281–295, 2014.
- [164] A. F. Martins, D. M. Dias, J.-F. Morfin, S. Lacerda, D. V. Laurents, É. Tóth, and C. F. Geraldès, "Interaction of PiB-Derivative Metal Complexes with Beta-Amyloid Peptides: Selective Recognition of the Aggregated Forms," *Chem.-Eur. J.*, vol. 21, no. 14, pp. 5413–5422, 2015.
- [165] J. Clarke, "Phenylamine as an amine." 2004.
- [166] E. S. Voropai, M. P. Samtsov, K. N. Kaplevskii, A. A. Maskevich, V. I. Stepuro, O. I. Povarova, I. M. Kuznetsova, K. K. Turoverov, A. L. Fink, and V. N. Uverskii, "Spectral properties of thioflavin T and its complexes with amyloid fibrils," *J. Appl. Spectrosc.*, vol. 70,

no. 6, pp. 868–874, 2003.

[167] A. A. Maskevich, V. I. Stsiapura, V. A. Kuzmitsky, I. M. Kuznetsova, O. I. Povarova, V. N. Uversky, and K. K. Turoverov, “Spectral Properties of Thioflavin T in Solvents with Different Dielectric Properties and in a Fibril-Incorporated Form,” *J. Proteome Res.*, vol. 6, no. 4, pp. 1392–1401, Apr. 2007.

[168] A. A. Maskevich, S. A. Kurhuzenkau, and A. Y. Lickevich, “Fluorescence spectral analysis of thioflavin T- γ -cyclodextrin interaction,” *J. Appl. Spectrosc.*, vol. 80, no. 1, pp. 36–42, 2013.

[169] A. Hawe, M. Sutter, and W. Jiskoot, “Extrinsic Fluorescent Dyes as Tools for Protein Characterization,” *Pharm. Res.*, vol. 25, no. 7, pp. 1487–1499, Jul. 2008.

[170] P. C. Sadek, *The HPLC solvent guide*, 2nd ed. New York: Wiley-Interscience, 2002.

[171] M. Lauwereys, “Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies,” *EMBO J.*, vol. 17, no. 13, pp. 3512–3520, Jul. 1998.

[172] M. Dumoulin, K. Conrath, A. Van Meirhaeghe, F. Meersman, K. Heremans, L. G. J. Frenken, S. Muyldermans, L. Wyns, and A. Matagne, “Single-domain antibody fragments with high conformational stability,” *Protein Sci. Publ. Protein Soc.*, vol. 11, no. 3, pp. 500–515, Mar. 2002.

[173] C. Pain, J. Dumont, and M. Dumoulin, “Camelid single-domain antibody fragments: Uses and prospects to investigate protein misfolding and aggregation, and to treat diseases associated with these phenomena,” *Biochimie*, vol. 111, pp. 82–106, Apr. 2015.

[174] S. Muyldermans, “Nanobodies: natural single-domain antibodies,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 82, pp. 775–797, 2013.

[175] M. Arbabi Ghahroudi, A. Desmyter, L. Wyns, R. Hamers, and S. Muyldermans, “Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies,” *FEBS Lett.*, vol. 414, no. 3, pp. 521–526, Sep. 1997.

[176] J. F. Poduslo, G. L. Curran, and C. T. Berg, “Macromolecular permeability across the blood-nerve and blood-brain barriers,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 91, no. 12, pp.

5705–5709, Jun. 1994.

[177] K. S. Rutgers, R. J. A. Nabuurs, S. a. A. van den Berg, G. J. Schenk, M. Rotman, C. T. Verrips, S. G. van Duinen, M. L. Maat-Schieman, M. A. van Buchem, A. G. de Boer, and S. M. van der Maarel, “Transmigration of beta amyloid specific heavy chain antibody fragments across the in vitro blood-brain barrier,” *Neuroscience*, vol. 190, pp. 37–42, Sep. 2011.

[178] T. Li, J.-P. Bourgeois, S. Celli, F. Glacial, A.-M. Le Sourd, S. Mecheri, B. Weksler, I. Romero, P.-O. Couraud, F. Rougeon, and P. Lafaye, “Cell-penetrating anti-GFAP VHH and corresponding fluorescent fusion protein VHH-GFP spontaneously cross the blood-brain barrier and specifically recognize astrocytes: application to brain imaging,” *FASEB J.*, vol. 26, no. 10, pp. 3969–3979, Oct. 2012.

[179] C. Haupt, I. Morgado, S. T. Kumar, C. Parthier, M. Bereza, P. Hortschansky, M. T. Stubbs, U. Horn, and M. Fändrich, “Amyloid Fibril Recognition with the Conformational B10 Antibody Fragment Depends on Electrostatic Interactions,” *J. Mol. Biol.*, vol. 405, no. 2, pp. 341–348, Jan. 2011.

[180] C. Haupt and M. Fändrich, “Biotechnologically engineered protein binders for applications in amyloid diseases,” *Trends Biotechnol.*, vol. 32, no. 10, pp. 513–520, Oct. 2014.

[181] S. Warnitz, “Nanobodies as novel tools to investigate the molecular mechanism of amyloid fibril formation and for early diagnosis,” Université de Liège, Rapport de Master 2 Recherche, 2015.

[182] A. B. Etame, R. J. Diaz, C. A. Smith, T. G. Mainprize, K. Hynynen, and J. T. Rutka, “Focused ultrasound disruption of the blood-brain barrier: a new frontier for therapeutic delivery in molecular neurooncology,” *Neurosurg. Focus*, vol. 32, no. 1, p. E3, Jan. 2012.

[183] N. J. Abbott and P. A. Revest, “Control of brain endothelial permeability,” *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.*, vol. 3, no. 1, pp. 39–72, 1991.

[184] E. E. Konofagou, Y.-S. Tung, J. Choi, T. Deffieux, B. Baseri, and F. Vlachos, “Ultrasound-induced blood-brain barrier opening,” *Curr. Pharm. Biotechnol.*, vol. 13, no. 7, pp. 1332–1345, Jun. 2012.

- [185] B. Marty, B. Larrat, M. Van Landeghem, C. Robic, P. Robert, M. Port, D. Le Bihan, M. Pernot, M. Tanter, F. Lethimonnier, and S. Mériaux, "Dynamic study of blood–brain barrier closure after its disruption using ultrasound: a quantitative analysis," *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 32, no. 10, pp. 1948–1958, Oct. 2012.
- [186] C. Couinaud, *Le foie: études anatomiques et chirurgicales*. Masson & Cie, 1957.
- [187] P. H. Weigel and J. H. N. Yik, "Glycans as endocytosis signals: the cases of the asialoglycoprotein and hyaluronan/chondroitin sulfate receptors," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1572, no. 2–3, pp. 341–363, Sep. 2002.
- [188] A. N. Zelensky and J. E. Gready, "The C-type lectin-like domain superfamily," *FEBS J.*, vol. 272, no. 24, pp. 6179–6217, Dec. 2005.
- [189] V. Rumjantseva, P. K. Grewal, H. H. Wandall, E. C. Josefsson, A. L. Sørensen, G. Larson, J. D. Marth, J. H. Hartwig, and K. M. Hoffmeister, "Dual roles for hepatic lectin receptors in the clearance of chilled platelets," *Nat. Med.*, vol. 15, no. 11, pp. 1273–1280, Nov. 2009.
- [190] T. Onizuka, H. Shimizu, Y. Moriwaki, T. Nakano, S. Kanai, I. Shimada, and H. Takahashi, "NMR study of ligand release from asialoglycoprotein receptor under solution conditions in early endosomes," *FEBS J.*, vol. 279, no. 15, pp. 2645–2656, Aug. 2012.
- [191] P. Chaumet-Riffaud, I. Martinez-Duncker, A.-L. Marty, C. Richard, A. Prigent, F. Moati, L. Sarda-Mantel, D. Scherman, M. Bessodes, and N. Mignet, "Synthesis and Application of Lactosylated, ^{99m}Tc Chelating Albumin for Measurement of Liver Function," *Bioconjug. Chem.*, vol. 21, no. 4, pp. 589–596, Apr. 2010.
- [192] A. Ketkar-Atre, T. Struys, T. Dresselaers, M. Hodenius, I. Mannaerts, Y. Ni, I. Lambrichts, L. A. Van Grunsven, M. De Cuyper, and U. Himmelreich, "In vivo hepatocyte MR imaging using lactose functionalized magnetoliposomes," *Biomaterials*, vol. 35, no. 3, pp. 1015–1024, Jan. 2014.
- [193] N. Jain, V. Rajoriya, P. Jain, and A. Jain, "Lactosaminated-N-succinyl chitosan nanoparticles for hepatocyte-targeted delivery of acyclovir," *J. Nanoparticle Res.*, vol. 16, no. 1, pp. 1–14, Dec. 2013.

- [194] G. Quan, X. Pan, Z. Wang, Q. Wu, G. Li, L. Dian, B. Chen, and C. Wu, "Lactosaminated mesoporous silica nanoparticles for asialoglycoprotein receptor targeted anticancer drug delivery," *J. Nanobiotechnology*, vol. 13, no. 1, Dec. 2015.
- [195] K. Ganesh, D. Archana, and K. Preeti, "Galactosylated Albumin Nanoparticles of Simvastatin," *Iran. J. Pharm. Res. IJPR*, vol. 14, no. 2, pp. 407–415, 2015.
- [196] M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. t Rebers, and F. Smith, "Colorimetric method for determination of sugars and related substances," *Anal. Chem.*, vol. 28, no. 3, pp. 350–356, 1956.
- [197] Y. Brummer and S. W. Cui, "Understanding carbohydrate analysis," *Food Carbohydr. Chem. Phys. Prop. Appl. CRC Taylor Francis*, 2005.
- [198] Y. Pomeranz and C. E. Meloan, *Food analysis: theory and practice*. 1994.

ANNEXE 1: PROTOCOLE DE SYNTHÈSE DES NPS AGuIX

Preparation of gadolinium oxide cores

A solution was prepared by dissolving 167.3 g of $[\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$ in 3 L of DEG at room temperature. The solution is then stirred for 3 hours at 140°C. Afterwards, 44.5 mL of sodium hydroxide solution (10 M) is added to the solution. This final solution is stirred for 5 hours at 180°C before cooling and stirring for 12 hours at ambient temperature. The gadolinium oxide cores displayed hydrodynamic diameters of 1.7 ± 0.5 nm.

Encapsulation of gadolinium oxide cores by polysiloxane

The polysiloxane shell is ensured by sol–gel process by addition of silane precursors. First, a solution containing 1.6 L of DEG, 51.42 mL of TEOS and 80.61 mL of APTES is slowly added (during 96 hours) to the precedent solution under stirring at 40°C. One hour after the end of the addition of the silane precursors, a second solution of 190 mL of DEG, 43.1 mL of water and 6.94 mL of TEA is added under stirring at 40°C during 96 hours. At the end of the second addition, the solution is stirred for 72 hours at 40°C and finally for 12 hours at ambient temperature. The gadolinium oxide cores coated by the polysiloxane displayed hydrodynamic diameter of 2.6 ± 1.0 nm.

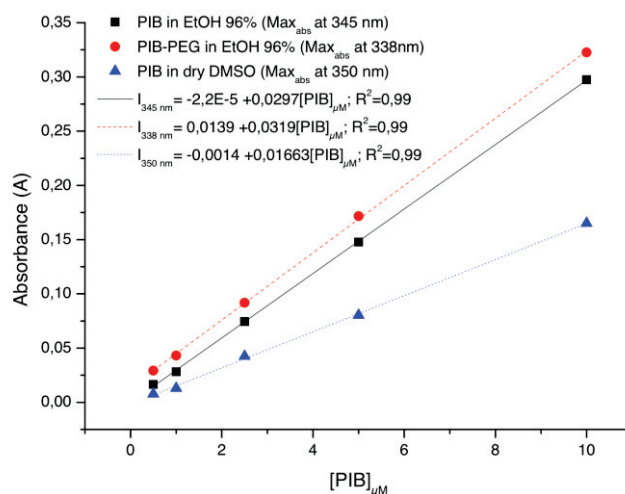
Covalent grafting of DOTAGA on the nanoparticles

163.7 g of DOTAGA anhydride are then added to the core-shell nanoparticles in DEG. The resulting solution is stirred for 72 hours at room temperature.

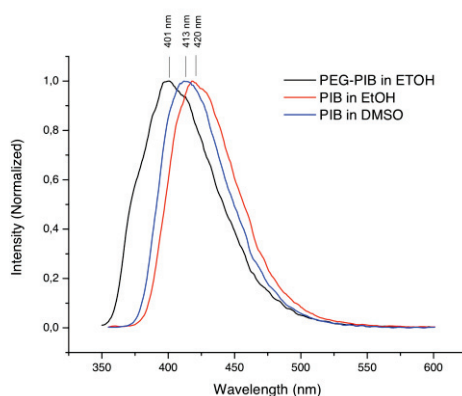
Purification

17.5 L of acetone are added to the solution to precipitate the nanoparticles that are filtered under vacuum before dispersion in water. The solution is stirred for one hour at pH 2 before remaining acetone is removed by evaporation. The nanoparticles are then purified by tangential filtration through 5 kDa membrane. The solution is stirred at pH 5 for 12 hours before another tangential filtration through 5 kDa membrane after addition of sodium hydroxide solution to reach pH 7.4. Afterward, the solution is filtered twice through a 1.2 μm and then 0.2 μm syringe filters to remove the largest impurities. Finally, the nanoparticles are freeze-dried and can be stored for months without alterations. After dispersion in water, the AGuIX nanoparticles display hydrodynamic diameter of 2.2 ± 1 nm.

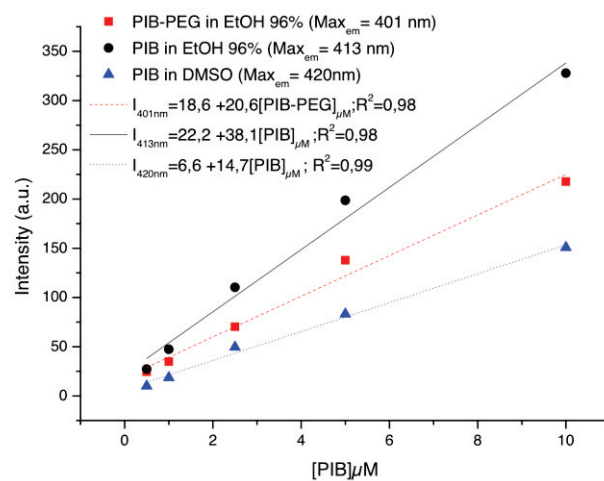
ANNEXE 2 : DROITE ETALON DE L'ABSORBANCE ET DE LA FLUORESCENCE DU PIB DANS L'ETHANOL ET LE DMSO



Maximum of absorption versus PIB concentration (in μM) for PIB in EtOH (black squares), PIB conjugated to PEG chain in EtOH (red circles) and PIB in DMSO (blue triangle).



Emission spectrum of PEG-PIB in EtOH ($\lambda_{\text{ex}}=335\text{ nm}$), PIB in EtOH ($\lambda_{\text{ex}}=345\text{ nm}$) and PIB in DMSO ($\lambda_{\text{ex}}=350\text{ nm}$).



Max of emission versus PIB concentration (in μ M) for PIB conjugated to PEG chain in EtOH (black squares), PIB in EtOH (red circles) and PIB in DMSO (blue triangle).

ANNEXE 3 : PROTOCOLE DE DOSAGE DU B10AP PAR SDS-PAGE

The concentration of B10AP grafted to silica-made nanoparticles (B10AP-Nps) was estimated by SDS-PAGE 15%. Different known amounts of B10AP were loaded in order to build a calibration curve. To reach this aim, the intensity of each spot was determined using Gel Doc™ EZ System scanner, and was plotted as function of the protein concentration of the samples. In the same gel, diluted solutions of B10AP-Nps were also loaded and the concentration in B10AP-Nps was calculated by a calibration curve using the spot intensities. The quantification is possible as nanoparticles are degraded in SDS so B10AP migrates similarly to the free B10AP. The images were analyzed with the program Bio-Rad's Image Lab software provided by the manufacturer and the calibration curve was done on Excel 2007.

RESUME

Cette thèse traite du développement de nanoparticules d'imagerie multimodale vectorisées pour détecter spécifiquement des dépôts amyloïdes ou certains récepteurs cellulaires. Ces nanoparticules, dénommées AGuIX (Activation et Guidage de l'Irradiation par rayonnement X), sont composées d'un squelette de polysiloxane fonctionnalisées par des chélates de DOTAGA(Gd^{3+}). Une fois marquées par un fluorophore organique ou des radioisotopes, ces Nps permettent de combiner jusqu'à trois techniques d'imagerie : l'IRM, qui présente une excellente résolution spatiale, et la scintigraphie et l'imagerie optique qui présentent toutes deux une excellente sensibilité. De par leur diamètre hydrodynamique inférieur à 5 nm, ces Nps sont efficacement éliminées par voie rénale et les différents tests *in vivo* réalisés n'ont pas révélé de toxicité de ces objets. Ainsi, les Nps AGuIX sont particulièrement indiquées dans le cadre d'un diagnostic précis et précoce de différentes pathologies.

L'objectif de la thèse consiste donc à greffer à la surface de ces Nps des vecteurs ciblant (i) les fibres amyloïdes ; (ii) les récepteurs asialoglycoprotéines des cellules hépatocytes du foie. Selon la nature du vecteur à greffer (i.e. molécule organique, peptide, fragment d'anticorps, ...) différentes stratégies ont été mises en place. Nous avons donc dans un premier temps optimisé les synthèses des Nps vectorisées, pour ensuite évaluer leur affinité pour leurs cibles respectives *in vitro* et/ou *in vivo*.

ABSTRACT

The goal of this PhD is to develop multimodal imaging nanoparticles vectorized for the detection of amyloid deposit or specific cells receptors. These Nps, called AGuIX (Activation and Guidance of X-Ray Irradiation) are composed of a polysiloxane network surrounded by DOTAGA(Gd^{3+}) chelates. One labeled with an organic dye or a radioisotope, these Nps could combine three imaging techniques such as MRI, known for its outstanding spatial resolution, and optical imaging and scintigraphy, known for their strong sensitivity. Thanks to their hydrodynamic diameter below 5 nm, they are efficiently eliminated from the body through renal clearance. Thus, these Nps are particularly indicated for earlier and more accurate diagnosis of a wide range of pathologies.

To target amyloid deposits or asialoglycoproteins receptors we optimized the grafting several ligands (i.e. small molecules, peptides, antibody fragments, ...). Then, we evaluated their affinity of their respective targets *in vitro* and/or *in vivo*.